

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



Identificación de nuevos componentes en la ruta
de transducción sensorial para la percepción de
la luz en *Phycomyces blakesleeanus*

Alejandro Miralles Durán
Tesis Doctoral
Universidad de Sevilla
2017

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



**Identificación de nuevos componentes en la ruta de
transducción sensorial para la percepción de la luz en
*Phycomyces blakesleeanus***

Trabajo presentado por el licenciado
Alejandro Miralles Durán

para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, abril de 2017

Director del trabajo:
Dr. Luis María Corrochano Peláez
Catedrático de Genética
Departamento de Genética, Facultad de Biología,
Universidad de Sevilla

El director de la Tesis

El doctorando

Dr. Luis M. Corrochano Peláez

Alejandro Miralles Durán

A Isa,
A mis padres,

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”.

Albert Einstein

ÍNDICE

RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	17
1. Respuesta a la luz en hongos.	19
1.1 La luz como estímulo ambiental.....	19
1.2 Los fotorreceptores.....	20
1.2.1 Proteínas del tipo <i>White Collar</i> de hongos.	21
1.2.1.1 <i>Neurospora crassa</i>	21
1.2.1.1.1 Funcionamiento del complejo White Collar	23
1.2.1.2 <i>Aspergillus nidulans</i>	27
1.2.1.3 Proteínas White Collar de Cigomicetos.....	29
1.2.2 Criptocromos	29
1.2.3 Fitocromos	31
1.2.4 Rodopsinas	33
1.3 Genes regulados por la luz en hongos.	34
2. El cigomiceto <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	35
2.1 Ciclo de vida.....	36
2.2.- Genómica de <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	38
2.2.1 Duplicación genómica en el subfilo Mucoromycotina.....	38
2.3 Genética de <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	39
2.4 Fotobiología de <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	41
2.4.1 Fototropismo.....	42
2.4.1.1 Fotorreceptores	42
2.4.1.2 Mutantes del fototropismo.	45
2.4.2 Fotomorfogénesis en <i>Phycomyces</i>	46
2.4.3 Fotocarotenogénesis en <i>Phycomyces</i>	47
2.4.3.1 Biosíntesis de β -caroteno en <i>Phycomyces</i>	49
OBJETIVOS	53
Capítulo 1: El papel del fotorreceptor WcoB en la fotobiología de <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	57
1.1 Introducción.....	59
1.2 Resultados	62
1.2.1 Acumulación de WcoB en <i>Phycomyces</i> tras exposiciones a la luz.	62
1.2.2 Localización subcelular de WcoB.....	64
1.2.3 Inmunoprecipitación de WcoB.	64
1.2.4 Regulación de la proteína WcoB en mutantes <i>carS</i>	67
1.2.5 Localización de la proteína WcoB-GFP en <i>Aspergillus nidulans</i>	69
1.2.6 Interacción entre WcoB y CarS de <i>Phycomyces</i> mediante BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) en <i>Aspergillus nidulans</i>	70
1.2.7 Ubiquitinación de WcoB en <i>P. blakesleeanus</i>	72
1.3 Discusión.....	73
Capítulo 2: El gen <i>madC</i> de <i>Phycomyces</i> y su homólogo en <i>Neurospora</i>	77
2.1 Introducción.....	79
2.2 Resultados	82
2.2.1 Ligamiento entre la mutación <i>madC</i> y marcadores moleculares en el genoma de <i>Phycomyces</i>	82
2.2.2 Caracterización del fototropismo de los descendientes de cada cruzamiento.	84
2.2.3 Comprobación del sexo de los descendientes de cada cruzamiento.	85

2.2.4 Estimación de la frecuencia de recombinación entre cada SNP y el gen <i>madC</i> .	86
2.2.5 Identificación del gen <i>madC</i> .	89
2.2.6 Transcripción del gen <i>madC</i> en <i>Phycomyces blakesleeanus</i> .	90
2.2.7 Transcripción del gen <i>ira-1</i> de <i>Neurospora crassa</i> homólogo al gen <i>madC</i> de <i>Phycomyces blakesleeanus</i> .	92
2.2.8 Regulación por luz de la proteína IRA-1 de <i>N. crassa</i> .	93
2.2.9 Localización subcelular de la proteína IRA-1::3xFLAG en <i>N. crassa</i> .	94
2.2.10 Presencia de la proteína IRA-1 en el estado vegetativo o conidial de <i>N. crassa</i> .	95
2.3 Discusión.	96
Capítulo 3: El gen <i>carC</i> de <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	99
3.1 Introducción	101
3.1.1 Las geranilgeranil pirofosfato sintasas (GGPPS).	101
3.1.2 Las GGPPSs de <i>Phycomyces</i> .	103
3.1.3 Regulación de la transcripción de los genes <i>ggsA</i> y <i>ggsB</i> .	104
3.1.4 El gen <i>carC</i> .	105
3.2 Resultados	106
3.2.1 Ligamiento entre la mutación <i>carC</i> y el gen <i>ggsA</i> .	106
3.2.2 Complementación de los genes <i>carC</i> y <i>ggsB</i> de <i>P. blakesleeanus</i> en <i>E. coli</i> .	109
3.2.3 Complementación del gen <i>carC</i> de <i>Phycomyces blakesleeanus</i> en <i>Neurospora crassa</i> .	115
3.2.3.1 Análisis de los transformantes.	117
3.3 Discusión.	119
DISCUSIÓN GENERAL	123
CONCLUSIONES	129
MATERIALES Y MÉTODOS	133
1. Estirpes usadas en esta tesis:	135
- <i>Phycomyces blakesleeanus</i> .	135
- <i>Neurospora crassa</i> :	135
- <i>Aspergillus nidulans</i> :	136
2. Oligonucleótidos usados en esta tesis.	136
3.- Medios y condiciones de cultivo.	138
3.1 Medios y condiciones de cultivo para <i>Phycomyces blakesleeanus</i> .	138
3.2 Condiciones de cultivo.	139
3.2.1 Condiciones de iluminación.	139
3.2.3 Cruzamiento sexual.	140
3.3.2 Medio sólido	141
3.3.2.1 Propagación de las cepas.	142
3.3.2.2 Recolección de conidios.	142
3.3.2.3 Crecimiento colonial.	143
3.3.2.4 Medio de cruce.	143
3.3.2.5 Inducción del desarrollo.	143
3.4 Medios y condiciones de cultivo para <i>Aspergillus nidulans</i> .	144
3.4.1 Disoluciones utilizadas (preparación por litro):	144
3.4.2 Medio Mínimo de <i>Aspergillus</i> con nitrato.	145
3.4.3 Medio Mínimo líquido con tartrato amónico.	145
3.4.4 Medio de Regeneración (MMR):	145

3.4.5 Medio de Regeneración-TOP (MMR-TOP):.....	145
3.4.6 Watch Minimal Medium (WMM <i>Aspergillus</i>):	145
3.5 Medios de cultivo para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> :	146
3.6 Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i> :.....	146
4. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.....	147
4.1 Extracción de ADN	147
4.2 Extracción de ARN.....	147
5. Reacción en cadena de la polimerasa.....	147
5.1 PCR convencional.....	147
5.2 RT- PCR cuantitativa.....	148
6. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	149
6.1 Choque térmico.....	149
7. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	149
8. Transformación de <i>Neurospora crassa</i>	150
8.1 Generación del casete para el etiquetado de genes.	150
8.2 Transformación del etiquetado.....	151
8.3 Transformación con el plásmido pMF272.	151
9. Proteínas.	152
9.1 Extracción de proteínas totales.....	152
9.2 Western blot.....	152
9.3 Tinción de geles de poliacrilamida.	153
9.3.1 Tinción Coomassie.....	153
9.3.2 Tinción con plata.....	154
10. Fraccionamiento subcelular y aislamiento de núcleos.....	154
10.1 <i>Phycomyces blakesleeana</i>	154
10.2 <i>Neurospora crassa</i>	155
11. Extracción de carotenos en <i>N. crassa</i>	156
12. Inmunoprecipitación de proteínas en <i>Phycomyces</i>	156
13. Microscopía óptica en <i>Aspergillus nidulans</i>	157
13.1 Transformación de <i>Aspergillus nidulans</i>	157
13.2 Etiquetado con GFP.	159
13.3 BiFC (Bimolecular Fluorescence Complement)	159
13.4 Condiciones de cultivo para los experimentos de microscopía.	160
13.4 Microscopio y obtención de imágenes.....	160
14. Ubiquitinación de WcoB en <i>Phycomyces</i>	160
BIBLIOGRAFÍA.....	161
AGRADECIMIENTOS.....	177

RESUMEN

Esta Tesis Doctoral se divide en tres capítulos que incluyen la caracterización del fotorreceptor WcoB, la identificación de MadC como una proteína reguladora de Ras que participa en la transducción de la señal luminosa y la confirmación de que CarC es una geranilgeranil pirofosfato sintasa que participa en el primer paso de la biosíntesis de β -caroteno, una de las rutas metabólicas reguladas por la luz en *Phycomyces*.

En el primer capítulo investigamos el papel de WcoB en la fotobiología de *Phycomyces* abordando desde su transcripción hasta la interacción con proteínas carotenogénicas. Nuestros resultados muestran que el gen *wcoB* se transcribe levemente en luz con respecto a la oscuridad, ocurriendo lo mismo a nivel de proteína. Nosotros hemos investigado la localización de WcoB en el micelio de *Phycomyces* observándose dicha proteína en la fracción citoplasmática. Con el fin de conocer la función de WcoB y las proteínas con las que interacciona se realizaron inmunoprecipitaciones de proteínas usando un anticuerpo contra WcoB. Estos experimentos revelaron que WcoB interacciona con proteínas implicadas en la síntesis de β -caroteno como CarS, CarRA y HmgS, además de interaccionar con proteínas tipo WC. Estos resultados sugieren que el fotorreceptor WcoB podría tener un papel regulador sobre la actividad de estas enzimas en la biosíntesis de β -caroteno y su regulación por la luz. Por último, visualizamos las proteínas WcoB y CarS fusionadas con la proteína fluorescente GFP *in vivo* usando como sistema heterólogo el hongo *Aspergillus nidulans*. Además, confirmamos la interacción entre WcoB y CarS usando la técnica BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) en *Aspergillus*.

En el segundo capítulo identificamos el gen *madC* de *P. blakesleeanus* en colaboración con el laboratorio del Prof. Idrum (Universidad Missouri-Kansas City, Kansas City, EEUU). La mutación en el gen *madC* disminuye la sensibilidad a la luz para el fototropismo del esporangióforo. Nuestros resultados han permitido identificar MadC como una GTPasa activadora de Ras. En los resultados obtenidos se confirmó la falta de un efecto significativo de la luz sobre la acumulación de ARNm del gen *madC* en la estirpe silvestre, al igual que en los mutantes del complejo Mad y los mutantes de los diferentes alelos del gen. Hemos investigado la regulación por la luz tanto del ARNm como de la proteína homóloga a MadC de *Neurospora*, conocida como IRA-1. Nuestros resultados indican que el gen *ira-1* no es fotoinducible y la cantidad de proteína IRA-1 no varía con la luz. La localización celular de IRA-1 indica que es una proteína

citoplasmática que debe interaccionar con Ras para regular su actividad. Además, su acumulación en los conidios sugiere un papel en la germinación y el crecimiento de la hifa. La identificación de MadC es un hito en la fotobiología de hongos que ha permitido identificar la primera proteína que participa en la cadena de transducción sensorial para el fototropismo después del receptor.

Uno de los efectos más llamativos de la luz es la activación de la síntesis del pigmento anaranjado β -caroteno. La primera etapa de su biosíntesis está catalizada por la sintetasa de geranilgeranil pirofosfato (GGPPS). En el tercer capítulo de esta tesis demostramos que la mutación en el gen *ggsA*, responsable de una GGPPS, está ligada a la mutación *carC*. Además, hemos confirmado la actividad GGPPS de CarC y GgsB utilizando como sistema heterólogo de expresión la bacteria *E. coli*. Con el fin de conocer si el gen *carC* puede complementar la función del gen *al-3* de *N. crassa* expresamos el ADNc del gen *carC* de *P. blakesleeanus* en un mutante *al-3* de *N. crassa*. Nuestros resultados demuestran que el gen *carC* de *P. blakesleeanus* no complementa la mutación del gen *al-3* de *N. crassa*, ya que los transformantes obtenidos producen la misma cantidad de carotenos que la estirpe no transformada. Nuestros resultados muestran que las mutaciones en el gen *ggsA* están ligadas al fenotipo de los mutantes *carC*, y confirmamos que *ggsA* es *carC* y que *carC* y *ggsB* codifican para proteínas con actividades GGPPS.

Los resultados obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral han permitido avanzar en el conocimiento de diferentes aspectos de las proteínas que usa *Phycomyces* para detectar la luz y regular su comportamiento y metabolismo.

INTRODUCCIÓN

1. Respuesta a la luz en hongos.

1.1 La luz como estímulo ambiental.

La luz es una fuente de energía esencial importante para la vida en la Tierra, y juega un papel fundamental como señal ambiental regulando el desarrollo y fisiología de muchos organismos, desde microbios a animales. La luz aporta energía para la fotosíntesis, calor y permite la visión en microorganismos, plantas y animales. La luz es esencial para organismos fotosintéticos, pero también para los que no lo son ya que permite informar sobre el entorno.

La primera respuesta a la luz azul fue observada por Charles R. Darwin (Darwin, 1881), cuando describió cómo la luz azul induce una respuesta fototrópica en plantas. Respuestas a la luz de diferentes longitudes de onda se han descrito en diferentes hongos, como las respuestas a la luz azul en *Neurospora crassa* (Liu et al., 2003) y *Phycomyces blakesleeanus* (Cerdá-Olmedo, 2001), a la luz roja en *Aspergillus nidulans* (Fuller et al., 2013; Mooney & Yager, 1990; Röhrig et al., 2013) y para ultravioleta en *Alternaria tomato* (Kumagai, 1989). La presencia de diferentes respuestas a la luz en diferentes hongos sugiere la presencia de múltiples sistemas fotorreceptores optimizados para operar a diferentes intensidades de luz o para distintas fotorrespuestas (Corrochano & Garre, 2010). Por ello, los hongos han desarrollado una compleja maquinaria de percepción y transducción de la señal lumínica mediante proteínas fotorreceptoras que les permite ajustarse a las condiciones ambientales y evitar los efectos nocivos del exceso de luz solar (Corrochano, 2007; Idnurm et al., 2010). Los efectos perjudiciales de la luz solar, como la radiación ultravioleta, son reducidos mediante la activación por luz, fundamentalmente luz azul, de pigmentos como carotenoides, y la activación de proteínas que reparan el ADN, como se ha demostrado recientemente con el criptocromo (CryA) en *Phycomyces* (Alejandre-Durán et al., 2003; Berrocal-Tito et al., 1999; Corrochano & Garre, 2010; Tagua et al., 2015). Las bacterias también son capaces de detectar y responder a la luz mediante el empleo de mecanismos altamente evolucionados. Existen sistemas moleculares para aprovechar la energía útil de la luz en las bacterias fototrópicas, para combatir los daños foto-oxidativos derivados de las especies altamente reactivas que se generan en la absorción de la energía de la luz, usando el estímulo de la luz para la reparación del ADN, y para dirigir el crecimiento, el desarrollo y la virulencia (Elías-Arnanz et al., 2011). Las

plantas también responden a la luz no sólo para optimizar la fotosíntesis, sino también para regular procesos importantes como la germinación, la de-etiolación, el movimiento de cloroplastos, el movimiento de estomas, la floración y el ritmo circadiano (Rockwell et al., 2006). El fototropismo y la evitación de sombras también están regulados por luz en las plantas ya que ésta promueve la activación de fototropinas que conducen a la formación de un gradiente de la hormona auxina promoviendo el crecimiento de la región estimulada por la luz. La mayor concentración de auxina en la sombra en comparación con el lado iluminado permite la reorientación del crecimiento hacia la luz (Fankhauser & Christie, 2015).

La luz regula el desarrollo y comportamiento de los hongos. El desarrollo de un hongo ocurre en varias etapas: germinación de esporas, crecimiento y ramificación de las hifas, y formación de las estructuras reproductoras para el desarrollo y dispersión de las esporas. Estos procesos están regulados por diferentes factores ambientales, incluyendo la presencia o ausencia de luz. La mayoría de las respuestas a la luz en hongos se deben principalmente a la luz azul; aunque también se conocen respuestas a otras longitudes de onda como la conidiación de *A. nidulans* regulada por luz roja o la conidiación en *A. tomato*, regulada por luz ultravioleta, por ejemplo. La luz azul actúa como señal ambiental responsable de la activación de rutas metabólicas como la síntesis de carotenos, o el crecimiento de estructuras reproductoras (Corrochano, 2007; Idnurm et al., 2010). La activación por la luz de la ruta de biosíntesis de carotenos en *Phycomyces blakesleeanus* y *Neurospora crassa* y el fototropismo de los cuerpos fructíferos de *Phycomyces* han servido como modelos de respuestas a la luz azul en hongos (Cerdá-Olmedo, 2001; Chen et al., 2010a; Corrochano & Garre, 2010; Idnurm et al., 2010; Linden et al., 1997a).

1.2 Los fotorreceptores.

Los fotorreceptores son cromoproteínas, proteínas que se unen a moléculas que absorben la luz, como flavinas, tetrapirroles o retinal (cromóforos). La luz recibida por el cromóforo da lugar a cambios conformacionales del fotorreceptor, iniciando una transducción de la señal y generando una respuesta en el organismo. Existen distintos tipos de fotorreceptores que se unen a diferentes cromóforos.

1.2.1 Proteínas del tipo White Collar de hongos.

1.2.1.1 *Neurospora crassa*.

Las proteínas fotorreceptoras de hongos denominadas “White Collar” (WC) reciben este nombre por el peculiar fenotipo de los mutantes *wc* de *Neurospora crassa* que resulta de la diferente regulación de la carotenogénesis en el micelio y en las esporas. Mientras que en el micelio la síntesis de carotenoides es estrictamente dependiente de la luz, en los conidios se acumulan carotenoides tanto en luz como en oscuridad. En los tubos de agar inclinado se forma una capa de micelio en la base que desarrolla una masa de hifas aéreas dedicada en su gran mayoría a la formación de conidios. El mutante *wc* presenta la masa aérea pigmentada, mientras que en la base se aprecia un anillo de color blanco, que le da nombre al mutante. Estos mutantes albinos son fácilmente distinguibles de los mutantes albinos alterados en los genes estructurales de la ruta biosintética (*al-1*, *al-2*, *al-3*), ya que los conidios en estos mutantes son blancos y por tanto toda la biomasa es blanca. Los mutantes *wc* no sólo carecen de fotocarotenogénesis sino que además carecen del resto de fotorrespuestas en *N. crassa*, como son la regulación por luz de la conidiación, ajuste por luz del ritmo circadiano y regulación por luz de la formación y comportamiento de los peritecios. Estos mutantes a pesar de ser ciegos, no presentan ninguna alteración en el crecimiento o la morfología (Degli-Innocenti & Russo, 1984). Se han descrito mutantes en los dos genes *wc*, *wc-1* y *wc-2*, y los dos genes se han clonado (Ballario et al., 1996; Linden et al., 1997b).

La característica común de las proteínas del tipo White Collar-1 (WC-1) es la presencia de un dominio LOV, dos dominios PAS que se encargan de la interacción proteína-proteína, y un dominio dedo de zinc para la interacción con el ADN, lo que les permite actuar como factores de transcripción (Froehlich et al., 2002; He et al., 2002). El dominio dedo de zinc no aparece en las proteínas WC-1 de hongos pertenecientes al grupo de los basidiomicetos y en algunas proteínas del tipo WC-1 de cigomicetos (Idnurm et al., 2010). Con respecto a las proteínas del tipo White Collar-2 (WC-2) se caracterizan por presentar un dominio PAS y un dominio dedo de Zn; careciendo de dominio LOV y por consiguiente sin la capacidad de actuar por sí mismas como fotorreceptores. Concretamente, la proteína WC-1 de *N. crassa* contiene tres dominios PAS (Ballario et al., 1998), una señal de localización nuclear (NLS) (Schwerdtfeger & Linden, 2000a), y un dominio dedo de zinc tipo GATA (Ballario et al., 1996). El

dominio NLS no es imprescindible para el transporte de WC-1 al núcleo; ya en el mutante de *wc-1* que carece del dominio NLS, WC-1 también es localizado en el núcleo. Parece ser necesaria la interacción de WC-1 con otras proteínas aún no conocidas para su transporte al núcleo; o la existencia de un dominio NLS no canónico (Wang et al., 2016). El primer dominio PAS es un dominio LOV y es el encargado de interaccionar con la flavina (FAD) que actúa como cromóforo (Froehlich et al., 2002; He et al., 2002). Los dominios LOV son dominios conservados de proteínas parecidos a los dominios de unión proteína-proteína denominados dominios PAS (Per Arnt Sim) que se unen a nucleótidos de flavina (FMN o FAD), y que están implicadas en respuestas a distintos estímulos como luz, oxígeno y voltaje (Christie, 2007; Christie et al., 1999). Estos dominios LOV absorben la luz dando lugar a la formación de un enlace covalente entre la flavina (FMN o FAD) y una cisteína del dominio LOV (Salomon et al., 2000). La flavina se localiza en el interior del dominio LOV unida de forma no covalente mediante puentes de hidrógeno, enlaces Van der Waals e interacciones electrostáticas (Crosson & Moffat, 2001; 2002; Kennis et al., 2004). Estudios mutacionales han demostrado que la cisteína no es esencial para la unión de flavina, pero es esencial para la reacción fotoquímica reversible. Si la cisteína del dominio LOV es reemplazada por una serina se pierde la transcripción de los genes dependiente de la luz (Cheng et al., 2003). Los dominios LOV están presentes en bacterias, hongos, plantas y animales; de hecho, mediante estudios bioinformáticos se ha sugerido que los dominios LOV eucariotas presentes en los fotorreceptores circadianos de plantas ZTL/ADO/FKF1 provienen de las cianobacterias; mientras que los dominios LOV de fototropinas de plantas, LOV de aureocromos, LOV de proteínas del tipo White Collar de hongos y dominios LOV presentes en proteínas animales provienen de alfa-proteobacterias (Herrou & Crosson, 2011).

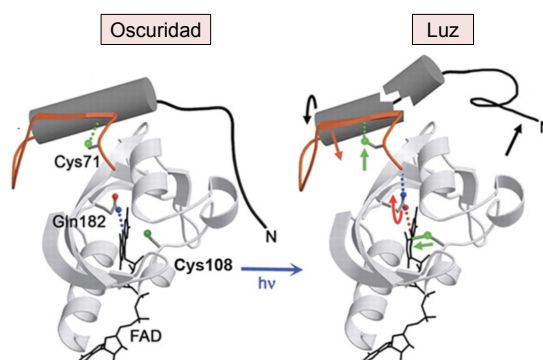


Figura I.1: Cambios conformacionales en el dominio LOV tras una exposición a la luz. Las flechas indican los cambios principales en la estructura después de la formación del enlace flavina- cisteína. Modificado de (Zoltowski et al., 2007).

La proteína WC-2 de *N. crassa* también presenta un dominio dedo de zinc tipo GATA, un dominio PAS y un dominio de localización nuclear (NLS) (Linden & Macino, 1997). El gen *wc-2* se expresa igual en luz que en oscuridad; y la estabilidad de su ARNm es independiente de las proteínas WC-1 o WC-2, pero su transcripción depende de WC-1 que lo regula negativamente (Cheng et al., 2003; Linden & Macino, 1997). WC-1 interacciona con WC-2 a través de los dominios PAS para formar el complejo White Collar (WC), que se une a los promotores de los genes fotoinducibles (Ballario et al., 1998; Cheng et al., 2002; Talora et al., 1999). *In vivo*, el complejo WC se une a los promotores de los genes fotoinducibles de manera transitoria, permitiendo la fotoactivación de estos genes (He & Liu, 2005). Las proteínas WC están presentes en la oscuridad y se localizan preferentemente en el núcleo, aunque ambas proteínas se someten a ciclos rápidos de trayectos núcleo-citoplasma y viceversa. La localización nuclear de cualquiera de las proteínas, WC-1 o WC-2, no se ve afectada por la luz, y además no se altera por mutaciones en *wc-2* o *wc-1*, respectivamente; lo que indica que la localización nuclear no requiere el complejo WC completo (Schwerdtfeger & Linden, 2000a). Además, la localización nuclear de WC-2 no parece depender de su señal de localización nuclear; ya que si ésta se elimina, la cantidad de WC-2 presente en el núcleo es la misma, por lo que debe existir otro mecanismo que regule su transporte al núcleo (Schwerdtfeger & Linden, 2000a).

1.2.1.1.1 Funcionamiento del complejo White Collar.

En la oscuridad, el complejo WC se une a unas secuencias conservadas denominadas LRE (*Light Response Elements*) localizadas en los promotores de los genes fotoinducibles (Froehlich et al., 2003; 2002; He & Liu, 2005; Smith et al., 2010). Las secuencias consenso propuestas para estos LRE son GATNC---CGATN, donde N puede ser cualquier nucleótido pero el mismo en ambas repeticiones (He & Liu, 2005); y GATCGA, con variabilidad en la primera y la última base (Smith et al., 2010). El complejo WC una vez unido a las secuencias LRE interacciona con la histona acetiltransferasa NGF-1 (Brenna et al., 2012). La activación de WC-1 por la luz promueve un cambio conformacional en la proteína que permite la formación de homodímeros de complejo WC a través de los dominios LOV de las subunidades WC-1 (Malzahn et al., 2010). Esto resulta en la activación de la histona NGF-1 permitiendo la acetilación transitoria de la lisina-14 en las histonas H3 asociadas con los promotores de

genes fotoinducibles como se ha mostrado para el gen *al-3* de *N. crassa* (Brenna et al., 2012; Grimaldi et al., 2006). La acetilación de la histona es revertida por una remodelación dependiente de ATP mediada por la enzima CSW-1 (ClockSwish-1) (Belden et al., 2007a).

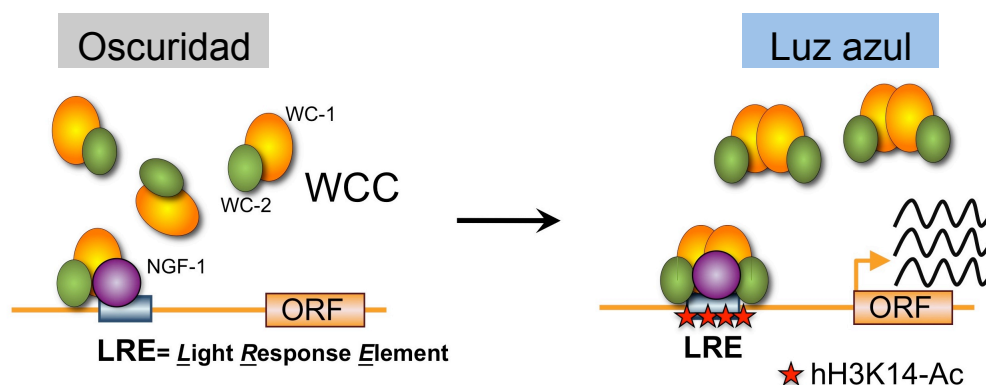


Figura I.2: Modelo simplificado para la activación de la transcripción por luz. La recepción de la luz mediante el cromóforo FAD de WC-1 debe dar lugar a la formación del enlace entre la flavina y la cisteína, provocando un cambio conformational que conduce a la dimerización del complejo WC, remodelación de la cromatina a través de la histona acetiltransferasa NGF-1, y la activación de la transcripción de genes. Las histonas modificadas son mostradas mediante estrellas en el sitio de unión al promotor. La exposición a la luz estimula la transcripción de los genes *vvd*, *frq*, y otros genes fotoinducibles. Figura modificada de (Olmedo et al., 2013).

La luz promueve la transcripción transitoria de *wc-1* (Ballario et al., 1996; Káldi et al., 2006) y la fosforilación de la proteína, lo que permite su degradación y reemplazamiento en el complejo WC por proteína WC-1 nuevamente sintetizada pero inactiva; reduciendo la capacidad del complejo WC para unirse a los promotores de genes fotoinducibles (He & Liu, 2005; Schwerdtfeger & Linden, 2000a; 2001; Talora et al., 1999). El gen *wc-1* tiene un promotor complejo con tres sitios diferentes de iniciación de la transcripción (Káldi et al., 2006), y es fotoinducible a través del complejo WC (Ballario et al., 1996). Por otro lado, WC-2 también es fosforilado después de exposiciones a la luz y dicha fosforilación es dependiente de WC-1. La fosforilación de WC-2 es más débil y no cambia cuando la exposición a la luz se prolonga. Mutaciones en el dedo de zinc de WC-2 dan lugar a la pérdida de la fosforilación dependiente de la luz (Schwerdtfeger & Linden, 2000b; Talora et al., 1999).

Neurospora crassa es capaz de responder a largas exposiciones lumínicas mediante un proceso llamado fotoadaptación (Arpaia et al., 1999; Lauter & Yanofsky, 1993; Schwerdtfeger & Linden, 2001; 2003). En este proceso interviene una proteína llamada VIVID (VVD). Esta proteína tiene 186 aminoácidos que actúa como receptor de luz azul mediante un dominio tipo LOV, al cual se le une una flavina (FMN o FAD) como cromóforo (Heintzen et al., 2001; Zoltowski et al., 2007). Estirpes de *N. crassa* con mutaciones en el gen *vvd* muestran una fosforilación prolongada de WC-1 en luz, una reducción en la cantidad de WC-1 en la célula, y una fotoactivación génica prolongada; sugiriendo que la fosforilación tiene un importante papel en la actividad transitoria del complejo WC y la fotoadaptación (He & Liu, 2005; Heintzen et al., 2001; Malzahn et al., 2010; Schafmeier et al., 2005; Schwerdtfeger & Linden, 2001; 2003; Shrode et al., 2001). VVD se activa por luz azul y forma dímeros mediante el dominio LOV (Peter et al., 2012; Zoltowski & Crane, 2008). La similitud del dominio LOV de VVD y WC-1 sugiere una posible interacción entre ellos interrumpiendo los dímeros del complejo WC activos; lo que da lugar a una atenuación de la transcripción. Los heterodímeros de complejo WC-VVD provocan la fotoadaptación debido a la inactivación del complejo WC. El complejo WC activo es rápidamente degradado, pero la interacción de complejo WC-VVD previene a dicho complejo de la degradación (Malzahn et al., 2010), y crea una cantidad de WC-1 activados por luz que son transcripcionalmente inactivos. La sobreexpresión de *vvd* resulta en una desensibilización del complejo WC (Chen et al., 2010b; Hunt et al., 2010; Malzahn et al., 2010).

En el proceso de fotoadaptación de *N. crassa* también participa la proteína quinasa C (PKC) (Arpaia et al., 1999; Franchi et al., 2005). Esta proteína interacciona con WC-1 in vivo y fosforila el dominio dedo de zinc (in vitro) de WC-1 en el micelio crecido en oscuridad o después de 2 horas de iluminación; cuando ya la luz ha provocado el cese de la expresión de genes fotoinducibles. Una estirpe con baja cantidad de PKC tiene incrementado los niveles de WC-1 lo que confirma que PKC es un regulador negativo de WC-1 (Franchi et al., 2005).

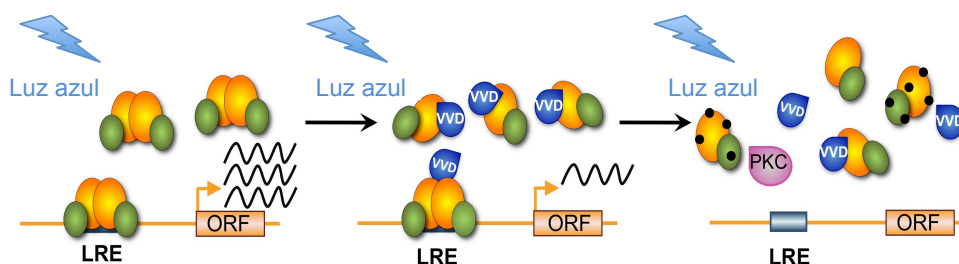


Figura I.3: Modelo simplificado para la activación de la transcripción por luz y fotoadaptación. La fotoactivación génica es transitoria. La proteína VVD nuevamente sintetizada compite con la proteína WC-1 activada e interrumpe la formación de dímeros de complejo WC unidos al promotor. El complejo WC unido a VVD no está transcripcionalmente activo y resulta en una atenuación de la respuesta a la luz. Diferentes fracciones de complejo WC activado por luz son estabilizados por FRQ (no mostrado), transitoriamente fosforilados (círculos negros) y parcialmente degradados, probablemente a través de una interacción con la proteína quinasa C (PKC) y otras quinasas y fosfatasas, algunas de ellas no identificadas. Modificado de (Olmedo et al., 2013).

En *N. crassa* existe otra proteína denominada PKA que es la principal quinasa que fosforila la proteína RCM-1 (Liu et al., 2015). RCM-1 interacciona con RCO-1 formando el complejo RCO-1/RCM-1, el cual participa en la fotoadaptación (Olmedo et al., 2010a; Sancar et al., 2011). En *N. crassa* este complejo actúa como represor de genes en oscuridad permaneciendo unido a los promotores de ciertos genes. En luz, el complejo RCO-1/RCM-1 deja libre los promotores de los genes fotoinducibles y entonces actúa el complejo WC, permitiendo la transcripción de los genes fotoinducibles. Después de tiempos prolongados de iluminación, se sintetiza la proteína VVD que interrumpe la interacción entre los dímeros de complejos WC, compitiendo VVD y WC-2 por los dominio LOV de WC-1. Este hecho provoca el cese de transcripción de los genes fotoinducibles tras exposiciones a la luz (Dasgupta et al., 2015; Olmedo et al., 2010a). El complejo RCO-1/RCM-1 es requerido para el mantenimiento de la estructura de la cromatina del locus de *frq* (Zhou et al., 2013). De hecho, se ha comprobado que dicho complejo es capaz de activar la transcripción de *frq* de manera independiente del complejo WC mediante la interacción de RCM-1 con la quinasa PKA (Liu et al., 2015). Además el complejo RCO-1/RCM-1 interviene en procesos metabólicos del hongo mediante unión directa con el ADN debido a la interacción del complejo con la proteína CSP-1, controlando su actividad mediante fosforilación (Sancar et al., 2011; Smith et al., 2010).

Genes homólogos de *wc* de *N. crassa* están presente en los genomas de la mayoría de clases de hongos: ascomicetos, basidiomicetos, cigomicetos y quitridos. La amplia distribución de este tipo de fotorreceptores en hongos sugiere una aparición temprana en la

evolución para regular las respuestas a la luz (Corrochano, 2007; Corrochano & Garre, 2010; Herrera-Estrella & Horwitz, 2007).

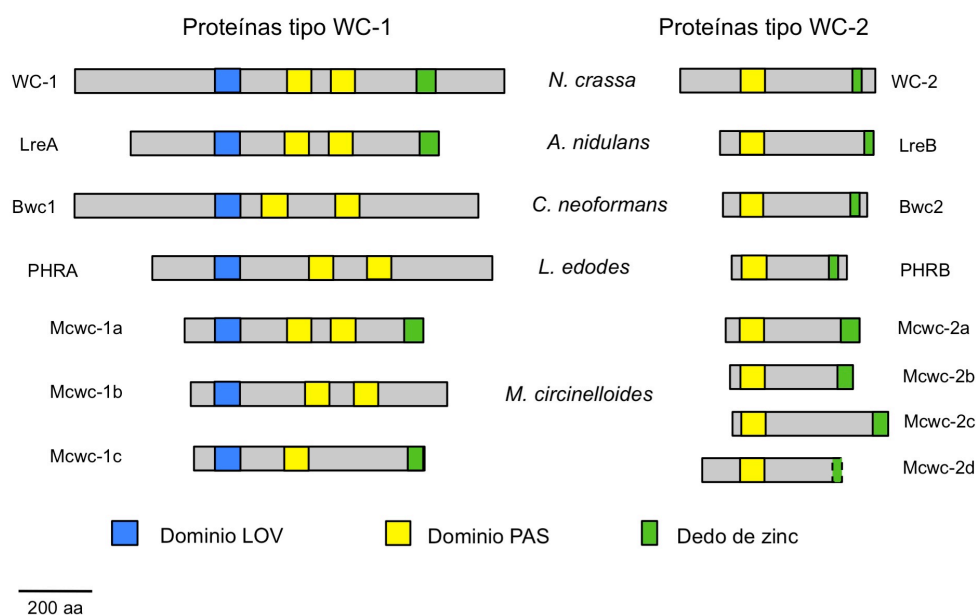


Figura I.4: Proteínas del tipo White Collar de diferentes grupos de hongos. Se muestran los dominios proteicos característicos de estas proteínas. Imagen tomada de la tesis de Víctor G. Tagua (Tagua, 2012).

1.2.1.2 *Aspergillus nidulans*.

Este hongo contiene genes que codifican proteínas homólogas a WC-1 y WC-2 de *N. crassa*; y son conocidas como LreA y LreB (*Light Response*). LreA está formada por 836 aminoácidos y presenta los dominios característicos de las proteínas tipo WC: un dominio LOV, dos dominios PAS, un dominio de señal de localización nuclear (NLS), y un dominio dedo de zinc tipo GATA en el extremo C-terminal (Crosson et al., 2003; Froehlich et al., 2002; He et al., 2002; Purschwitz et al., 2008). LreB contiene 417 aminoácidos, carece de dominio LOV, y tiene un dominio PAS, un dominio de señal nuclear (NLS) y un dominio dedo de zinc. Mediante análisis de mutantes ($\Delta lreA$ y $\Delta lreB$) se ha comprobado que la producción de conidios se reduce mucho con independencia de la presencia o no de luz, lo que sugiere una función represora de las proteínas LreA y LreB en la conidiación mediante la interacción de estas proteínas con el sistema de regulación Velvet a través del fitocromo FphA (Bayram O et al., 2010; Calvo, 2008; Purschwitz et al., 2008).

El desarrollo sexual en *A. nidulans* ocurre preferiblemente en oscuridad. Bajo estas condiciones, la delección de *lreA* causó una reducción del 70% en la formación de

cleistotecios; mientras que la delección de *lreB* sólo causó una reducción del 30%. En luz blanca, la formación de cleistotecios se inhibe en la estirpe silvestre y prácticamente desaparece en los mutantes *lreA* o *lreB*, sugiriendo un efecto aditivo de la luz y la ausencia de las proteínas Lre. LreA y LreB actúan como activadores del ciclo sexual y su actividad se reprime por la luz a través de la acción del fitocromo FphA y el sistema de regulación Velvet (Calvo, 2008). Mediante el empleo de la técnica BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*) se ha comprobado que LreB interacciona con el fitocromo FphA; demostrando que los sistemas de detección de luz azul y luz roja interaccionan. Por el contrario, LreA únicamente interacciona con LreB (Bayram O et al., 2010; Purschwitz et al., 2008). Existe una proteína denominada Velvet (VeA) miembro de la familia de proteínas que actúan como reguladores del metabolismo secundario y la esporulación en hongos (Calvo, 2008). Las proteínas de esta familia contienen un dominio de localización nuclear bipartito (NLS) en el extremo N-terminal y también un dominio de exportación nuclear (NES). También presentan en el extremo C-terminal una región rica en prolinas (PEST) que son típicas de proteínas inestables (Bayram et al., 2008a). El complejo VelB/VeA/LaeA coordina la percepción de la luz con el desarrollo y metabolismo secundario del hongo a través de la interacción de VeA con el fitocromo FphA el cual a su vez se une a las proteínas del complejo WC (LreA/LreB) a través de LreB. De esta manera, la luz se transmite a los componentes de luz azul y roja controlando la actividad del complejo Velvet a través de la interacción (Bayram O et al., 2010; Purschwitz et al., 2008). VeA se localiza mayoritariamente en el núcleo en micelios crecidos en oscuridad y permanece mayoritariamente en el citoplasma en luz (Stinnet et al., 2007). *Aspergillus nidulans* tiene otras proteínas de la familia Velvet como VelB, VelC y VosA. VelB interviene en el metabolismo secundario y ciclo sexual del hongo (Bayram et al., 2008a); VosA es necesario para la acumulación de trehalosa en esporas y para la producción de micotoxina (Ni et al., 2010). Esta proteína es necesaria para interaccionar con VelC cuya función está siendo investigada.

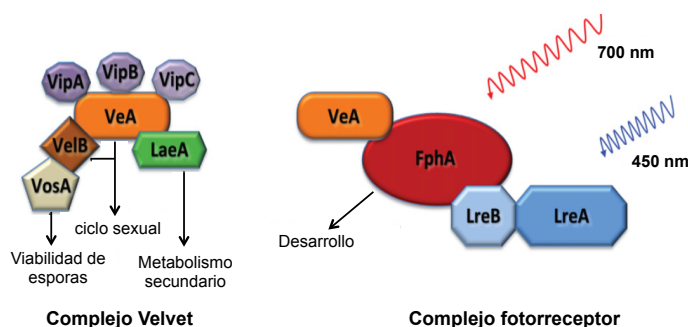


Figura I.5: Esquema de los dos complejos reguladores Velvet, el complejo Velvet y el complejo fotorreceptor (Rodríguez-Romero, J et al, 2010).

1.2.1.3 Proteínas White Collar de Cigomicetos.

Algunos hongos tienen duplicado en su genoma los genes homólogos a *wc-1*, siendo esto más evidente en los hongos del subfilo Mucoromycotina, que tienen tres genes muy parecidos a *wc-1* (Corrochano et al., 2016; Idnurm et al., 2006). Por ejemplo, *Phycomyces blakesleeanus* tiene tres genes homólogos de *wc-1* y cuatro genes homólogos de *wc-2* (Sanz et al., 2009) que se describirán en más detalle en la sección 2.4 de esta Introducción: “Fotobiología de *Phycomyces blakesleeanus*”.

En *Mucor circinelloides* también se han descrito tres genes *wc-1*, uno de ellos, *mcwc-1a*, es necesario para el fototropismo *mcwc-1c* es necesario para la fotoinducción de la carotenogénesis (Silva et al., 2006) y *mcwc-1b* da lugar a un regulador positivo de la carotenogénesis (Silva et al., 2008). Estos genes homólogos a *wc-1* presentan dos dominios PAS, un dominio LOV y un dominio dedo de zinc, excepto *mcwc-1b* que carece de este último dominio (Silva et al., 2006; 2008). *Mucor* también contiene en su genoma cuatro genes homólogos de *wc-2*, denominados *mcwc-2a*, *mcwc-2b*, *mcwc-2c* y *mcwc-2d* (Corrochano & Garre, 2010). La función de estos genes todavía es desconocida. Otro cigomiceto, *Rhizopus oryzae*, presenta en su genoma tres genes homólogos de *wc-1* y cinco genes homólogos de *wc-2* (Corrochano & Garre, 2010).

1.2.2 Criptocromos.

Los criptocromos son flavoproteínas fotorreceptoras de luz azul identificada por primera vez en *Arabidopsis thaliana* (Ahmad & Cashmore, 1993), donde juegan un papel importante en crecimiento y desarrollo de la planta y han sido identificadas en bacterias, arqueas y muchos eucariotas (Chaves et al., 2011). Los criptocromos están estructuralmente relacionados con las fotoliasas (Müller & Carell, 2009), que son flavoproteínas que catalizan la reparación de ADN dependiente de la luz (Sancar, 2003;

Todo, 1999). Además de compartir similares dominios fotoactivos, criptocromos y fotoliasas unen al mismo cofactor, lo que lleva a la idea de que fotoliasas son ancestros de los criptocromos (Brudler et al., 2003; Chaves et al., 2011; Sancar, 2003). El cofactor que unen criptocromos y fotoliasas de forma no covalente es el FAD (Flavina Adenina Dinucleótido). También se han identificados otros cofactores secundarios como el meteniltetrahidrofolato (MTHF) y la deazarriboflavina, que actúan como cromóforos antena (Geisselbrecht et al., 2012; Klar et al., 2006; Sancar, 2003). Los criptocromos se distinguen de las fotoliasas en que han perdido o tienen reducida la actividad reparadora de ADN y han ganado un nuevo papel en señalización celular. Sin embargo, existen varios ejemplos de fotoliasas, incluyendo algunas de hongos, que presentan una función dual como enzima que repara ADN y a la vez actúa como fotorreceptor (Bayram et al., 2008b; Berrocal-Tito et al., 2007; Heijde et al., 2010). Los criptocromos constan de una región N-terminal similar a una fotoliasa (PHR) que se une a dos cromóforos, el flavín-adenín dinucleótido (FAD) y el 5,10-meteniltetrahidrofolato (MTHF)/pterina (Lin & Shalitin, 2003), y un extremo carboxilo terminal de longitud variable al que se le asignan funciones de transducción de señales (Lin & Todo, 2005).

Los análisis filogenéticos de los criptocromos sugieren que estas proteínas pueden ser agrupados en tres clases: criptocromos de plantas, criptocromos de animales y criptocromos DASH (*Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, *Human*) (cry-DASH) (Lin & Todo, 2005). Los criptocromos de plantas y animales actúan como fotorreceptores y carecen de actividad reparadora de ADN. Sin embargo, los cry-DASH tienen propiedades estructurales y fotoquímicas más similares a fotoliasas, conservando una actividad reparadora de ADN disminuida, y sus posibles papeles en señalización no han sido todavía bien establecidos. Los criptocromos cry-DASH tienen muy débil o ninguna actividad fotoliasa de ADN de cadena doble, pero un alto grado de especificidad y actividad fotoliasa de dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) en el ADN monocatenario (Pokorny et al., 2008; Selby & Sancar, 2006). Los Cry-DASH deben representar una forma intermedia entre criptocromos y fotoliasas (Lin & Todo, 2005; Sancar, 2003).

Se ha descrito que la familia criptocromo-fotoliasa podría tener en hongos un importante papel en señalización y reparación de ADN. Parece que estas proteínas intervienen en la regulación de genes en numerosas especies de hongos. La delección del

gen del criptocromo (*cryA*) en *Aspergillus nidulans* desencadena la formación de estructuras sexuales e induce la transcripción de los reguladores de la formación de cuerpos fructíferos. CryA es una fotoliasa de CPD de clase I y es un represor del desarrollo sexual bajo la luz ultravioleta (350-370 nm) y además posee una actividad reparadora de ADN como las fotoliasas (Bayram et al., 2008b). En *Neurospora crassa*, CRY es un cry-DASH que es capaz de unirse a ADN y ARN de cadena sencilla y doble, aunque no hay evidencia de que tenga actividad fotoliasa *in vivo*. El gen *cry* de *N. crassa* es inducido por luz azul de forma dependiente de WC-1 y está regulado por el ritmo circadiano con un pico de abundancia opuesto a *frq*, el principal regulador del ritmo circadiano (Froehlich et al., 2010; Nsa et al., 2015); y se ha propuesto que funciona como modulador de la actividad transcripcional del complejo White Collar en algunos genes como *con-10*, *al-1* o *vvd* (Olmedo et al., 2010b)

El hongo *Phycomyces blakesleeanus*, que ha sido utilizado como organismo modelo para esta tesis tiene un gen, *cryA*, que codifica para un criptocromo de la familia cry-DASH. El gen *cryA* se induce por luz azul durante el crecimiento vegetativo y se reprime durante la interacción sexual; y para ello requiere la actividad del complejo fotorreceptor Mad, formado por las proteínas MadA y MadB, homólogas de WC-1 y WC-2 de *N. crassa* (Tagua et al., 2015). Se ha propuesto que CryA juega un papel importante en la reparación de ADN que se había observado en esporas tras tratamiento con radiación UV (Galland, 1995). Recientemente se ha demostrado el papel de CryA en la reparación de lesiones CPD en ADN de doble cadena además lo que sugiere que CryA de *P. blakesleeanus* representa un etapa temprana en la evolución de los criptocromos (Tagua et al., 2015).

1.2.3 Fitocromos.

Los fitocromos son proteínas fotorreceptoras que reaccionan con la luz roja y la luz roja lejana a través de un cromóforo tetrapirrólico lineal, y que usualmente presentan un dominio quinasa para la transducción de señales (Karniol et al., 2005; Rockwell et al., 2006). Los fitocromos fueron identificados inicialmente en plantas, aunque están presentes también en hongos y en bacterias (Karniol et al., 2005). Los fitocromos presentan una región fotosensora en el extremo amino que consta de un dominio PAS que sólo aparece en fitocromos de bacterias y hongos, un dominio GAF (cGMP

fosfodiesterasa/ Adenilato ciclasa/ FhIA) que tiene actividad bilin liasa y contiene una cisteína conservada que une el cromóforo, un dominio exclusivo de cromóforos llamado PHY, y una región reguladora en su extremo carboxilo terminal que varía enormemente según las especies pero que siempre contiene un dominio relacionado con las quinasas de histidina (HKRD) (Mathews & Sharrock, 1996).

Los fitocromos son cromoproteínas solubles que existen en dos formas interconvertibles que son diferenciadas por sus máximos de absorción y sus estructuras. Estas proteínas son sintetizadas en la conformación Pr que absorbe luz roja. La absorción de luz roja provoca cambios en el cromóforo seguidos por cambios de la conformación de la proteína. Los cambios estructurales van acompañados de cambios en la absorción máxima del fitocromo, que pasa de absorber en el rojo (660 nm) a absorber luz roja lejana (730 nm) en la forma Pfr. La forma Pfr puede absorber luz del rojo lejano para volver al estado Pr. La relación entre ambos estados determina el estado de señalización del fitocromo. Por tanto, en la mayoría de los casos, las respuestas son inducidas por la luz roja y revertidas por el rojo lejano, dando lugar al concepto de que la forma Pfr es la forma biológicamente activa (Rodríguez-Romero et al., 2010).

En los genomas de algunos hongos también se han encontrado genes para fitocromos aunque en los genomas de cigomicetos no se han descrito. Los fitocromos de hongos están más estrechamente relacionados con los fitocromos de bacterias aunque los fitocromos de hongos presentan un dominio regulador en la región carboxilo terminal de la proteína y las bacterias tienen los módulos (quinasa y regulador) separados en dos genes (Idnurm et al., 2010). La conservación de la secuencia en el dominio de unión del cromóforo y la estructura de dominios de la proteína indican que los fitocromos de hongos son más similares a los fitocromos bacterianos que a los de plantas lo que sugiere un posible origen evolutivo (Corrochano, 2007; 2011). Sin embargo, el papel de los fitocromos en la fotobiología de los hongos no está claro. La falta de fenotipos claros en los mutantes de fitocromos en algunos hongos hace que sea difícil asignar un papel a estos fotorreceptores en la biología de estos organismos. En *Aspergillus* está bien caracterizado el fitocromo FphA. En *A. nidulans* la proteína FphA regula la transición de ciclo asexual a sexual y la biosíntesis de metabolitos secundarios en respuesta a la luz y también posee una función represora en la formación de cleistotecios (Rodríguez-Romero et al., 2010). Esta proteína también está implicada en la activación por la luz del gen *brlA* de ahí

su papel en esporulación (Ruger-Herreros et al., 2011). FphA forma un complejo con el sistema sensorial de luz azul controlado por el complejo *White Collar* (Purschwitz et al., 2008), interaccionando físicamente con LreB (homólogo a WC-2 de *N. crassa*), que interacciona a su vez con LreA (homólogo a WC-1 de *N. crassa*). Estas interacciones ocurren en el núcleo aunque el fitocromo sea una proteína mayoritariamente citoplasmática (Purschwitz et al., 2008). FphA también interacciona con VelvetA (VeA), cuyos homólogos están emergiendo como reguladores para el metabolismo secundario y esporulación en hongos (Calvo, 2008), explicado anteriormente en la sección 1.2.1.2.

En *A. nidulans* se ha comprobado que el fitocromo FphA interacciona físicamente con una fosfotransferasa denominada YpdA, que a su vez fosforila a la MAP quinasa SakA de manera dependiente de la luz roja. En ausencia del fitocromo, SakA responde al estrés osmótico pero no a la luz. Por lo tanto, en este hongo se revela que la percepción de la luz roja es transmitida mediante la vía HOG (High Osmolarity Glycerol) a través de la cascada de MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). Este proceso podría integrar varias respuestas a estrés y SakA puede ser considerada el núcleo para el procesamiento de diferentes señales ambientales (Zhenzhong et al., 2016).

1.2.4 Rodopsinas.

Las rodopsinas son proteínas de membrana que constan de siete hélices transmembranales que forman un bolsillo interior para el cromóforo *all-trans*-retinal, el cual está unido covalentemente a través de una base de Schiff protonada a un residuo de lisina en la hélice G (García-Martínez et al., 2015; Sharma et al., 2006).

El papel de las rodopsinas en fotobiología de hongos no está todavía claro. *N. crassa* contiene en su genoma un gen llamado *nop-1* que codifica para una rodopsina, NOP-1, que es una rodopsina que une *todo-trans*-retinal como cromóforo (Bieszke et al., 1999). La inactivación de este gen no da lugar a un fenotipo evidente, pero el patrón de expresión del gen nos permite intuir un papel en el desarrollo de las estructura reproductivas de *Neurospora* (Bieszke et al., 1999) y en la derrepresión de la respuesta transcripcional a la luz de varios genes (Olmedo et al., 2010b). Los niveles de ARNm del gen aumentan al inducirse la conidiación indicando una relación de *nop-1* con los genes de la conidiación (Bieszke et al., 2007). En los genomas de *Fusarium* existen genes que codifican para dos rodopsinas diferentes, llamadas *OpsA* en *F. fujikuroi* (Estrada &

Avalos, 2009) y *CarO* (Prado et al., 2004). La mutación de *OpsA* no produce cambios fenotípicos pero disminuyen los niveles de ARNm de los genes *car* aunque el contenido total de caroteno no se ve alterado (Estrada & Avalos, 2009). *CarO* es una bomba de protones activada por luz verde que se encuentra predominantemente en la membrana citoplasmática de los conidios. La tarea de *CarO* podría ser la de retardar la germinación de los conidios bajo la luz para mejorar las posibilidades de infección. *CarO* exhibe un fotociclo rápido y se satura a altas intensidades de luz, por lo que podría ser útil para que el hongo pueda ahorrar energía durante el día (García-Martínez et al., 2015).

1.3 Genes regulados por la luz en hongos.

La diversidad de respuestas a la luz en hongos sugieren la presencia de diferentes genes regulados por luz en los genomas de hongos (Idnurm et al., 2010; Tisch & Schmoll, 1994). Se han realizado experimentos de hibridación de microarrays en *Neurospora crassa* (Chen et al., 2009; Dong et al., 2008; Lewis et al., 2002; Smith et al., 2010), *Cryptococcus neoformans* (Idnurm & Heitman, 2010), *Trichoderma atroviridae* (Rosales-Saavedra et al., 2006) y *Aspergillus nidulans* (Rodríguez-Romero et al., 2010; Ruger-Herreros et al., 2011) para detectar diferencias transcripcionales debidas a la luz. El número de genes regulados por luz varía entre hongos, siendo del 0.25% en *C. neoformans*, el 2.5% en *A. nidulans*, el 2.8% en *T. atroviridae* y entre el 3-7% en *N. crassa*. Estos resultados no son comparables al estar realizados en distintas condiciones, con distintos medios de cultivo, condiciones de iluminación, etc, pero muestran una apreciable activación por la luz del transcriptoma de los hongos investigados. Se conocen pocos genes fotorregulados en todos los hongos. Los genes que están a menudo regulados por luz son fotoliasas para reparar ADN (Chaves et al., 2011) o enzimas para la biosíntesis de carotenos; aunque debe tenerse en cuenta que las fotoliasas están ausentes en algunos genomas de hongos y que la biosíntesis de carotenos no está inducida por luz en algunos hongos. Las fotoliasas y el caroteno juegan un papel en la protección contra la luz UV, por lo tanto la activación de estos genes por luz permite incrementar dicha protección (Idnurm & Heitman, 2010; Idnurm et al., 2010). Otros genes fotorregulados están implicados en procesos biológicos como el ritmo circadiano y la conidiación. Existen también genes regulados por luz que participan en procesos tales como el metabolismo y el transporte del carbono, reacciones redox, respuestas a estrés, ciclo

celular y procesamiento de ADN, síntesis de proteínas, rescate celular, defensa, virulencia y transporte celular. Algunos de estos genes son factores de transcripción probablemente implicados en la activación de rutas de señalización dependientes de la luz (Dong et al., 2008; Rosales-Saavedra et al., 2006; Ruger-Herreros et al., 2011).

El análisis global de la regulación de genes por luz en hongos sugiere la importancia de la luz para adaptarse a las duras y cambiantes condiciones ambientales. También ocurren cambios durante el ciclo día/noche para la hifas que crecen en la superficie, el aumento de la temperatura durante el día, la disminución de la humedad y la aparición de las especies reactivas de oxígeno. Un reloj circadiano presente en muchos hongos les permite prever los cambios que se presentan cada mañana para prevenirlos antes de que aparezcan y les provoquen algún tipo de daño (Rodríguez-Romero et al., 2010).

2. El cigomiceto *Phycomyces blakesleeanus*.

Phycomyces blakesleeanus es un hongo filamentosos saprófito y terrestre. Pertenecer al subfilo *Mucoromycotina*, orden *Mucorales*, familia *Mucoraceae*. Este hongo ha sido encontrado en ambientes húmedos en diversas regiones del mundo. *Phycomyces* fue descrito por primera vez por C.A. Agardh, quien inicialmente lo confundió con un alga verde y lo denominó *Ulva nitens* (Agardh, 1817). El nombre de *Phycomyces* “hongo alga” fue asignado en 1823. La especie original, *Phycomyces nitens*, fue dividida en dos denominadas como la anterior, *P. nitens* y otra especie llamada *P. blakesleeanus*, que es la que se utiliza en los laboratorios de investigación y la usada en esta tesis doctoral. La razón por la que se encuentra *Phycomyces* en los laboratorios es la sensibilidad a diferentes estímulos ambientales, sobre todo, su sensibilidad a la luz (Carnoy, 1870; Massart, 1888).



Figura I.6: Aspecto de *Phycomyces* con los cuerpos fructíferos.

2.1 Ciclo de vida.

Phycomyces blakesleeanus tiene un ciclo de vida sexual y asexual (Figura I.7), y es haploide, lo que permite la expresión de mutaciones recesivas. Además, *Phycomyces* presenta un micelio cenocítico y sus esporas contienen varios núcleos excepto algunas que son uninucleadas. La espora contiene un promedio de 3 ó 4 núcleos y tan sólo el 0,3% de esporas son uninucleadas. Para la germinación masiva y simultánea de esporas es necesario someterlas a un choque térmico de 48°C durante 15 minutos o también por la presencia de ciertos compuestos químicos como acetato o propionato (Rivero & Cerdá-Olmedo, 1994; Robbins & Kavanagh, 1942; Vanmulders & AJ, 1986). Las hifas contienen múltiples núcleos haploides que aparecen tras la mitosis de los núcleos que estaban presentes en la espora. El micelio tiene una velocidad de crecimiento de dos centímetros diarios, siempre que haya nutrientes y las condiciones ambientales lo permitan. Tras el crecimiento vegetativo comienza un proceso de diferenciación en hifas aéreas no ramificadas denominadas esporangióforos. El esporangióforo desarrolla en su extremo apical una esfera, el esporangio, que contiene núcleos con los que se formarán las esporas vegetativas. *Phycomyces* desarrolla dos tipos de esporangióforos, los micróforos, de hasta tres milímetros de longitud y los macróforos de varios centímetros o decímetros de longitud. La formación de un tipo u otro estará determinado por la luz, el medio de cultivo, la disponibilidad de oxígeno o la densidad del cultivo (Cerdá-Olmedo, 2001; Cerdá-Olmedo & Lipson, 1987a; Corrochano & Cerdá-Olmedo, 1992).

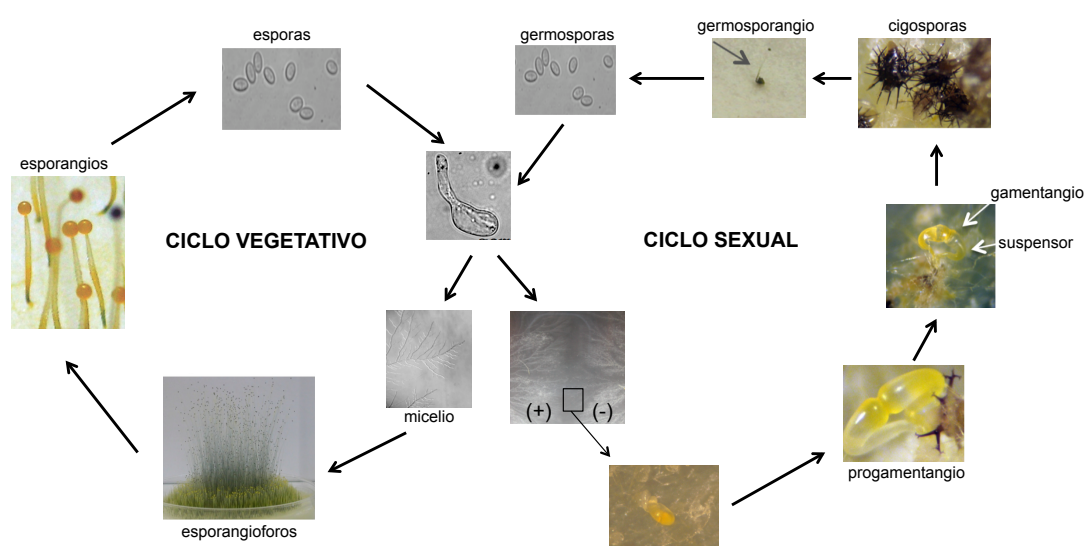


Figura I.7: Ciclos de vida de *Phycomyces*. Imágenes cedidas por la Dra. Dolores Pérez de Camino Cantos.

Blakeslee en 1904 reconoció en las estirpes de los mucorales dos sexos que llamó (+) y (-), indistinguibles morfológicamente salvo por la capacidad de reaccionar sexualmente cuando se encuentra un micelio de sexo contrario y las condiciones ambientales son las idóneas (Blakeslee, 1906). *Phycomyces* por tanto es heterótalico ya que existen sexos diferenciados. Los genes responsables del sexo en *Phycomyces* se denominan *sexM* y *sexP* (Idnurm et al., 2008). Cada gen se encuentra en el locus sexual, una región de 5,8 kb para sexo (+) y de 3,4 kb para sexo (-) que contiene ADN repetido. Estos genes codifican para proteínas con un dominio HMG (*High Mobility Group*), que se ha descrito en genes asociados al locus del sexo de otros hongos y levaduras. Los genes del sexo tienen tamaños diferentes, 636 pares de bases en *sexM* y 723 pares de bases para *sexP*; y presentan distinta orientación en el genoma del hongo (Idnurm et al., 2008). No se conoce la manera en la que estas proteínas intervienen en la interacción sexual.

La cercanía de micelios de distinto sexo en un medio sólido adecuado induce el comienzo del ciclo sexual de *Phycomyces*. Ambos sexos, antes de ponerse en contacto, difunden señales químicas específicas (Burgeff, 1924) en la primera demostración de feromonas en la naturaleza. Aún no ha sido identificado el compuesto químico, pero se conoce que es un derivado del β -caroteno ya que los mutantes que no pueden sintetizarlos no son capaces de estimular a la estirpe de sexo contrario (Burgeff, 1924; Sutter, 1975b). La principal hormona sexual parece ser el ácido trispórico (Bullock et al., 1974; Nieuwenhuis & Vandenende, 1975; Schimek & Wöstemeyer, 2009). Cuando las señales químicas de una estirpe son percibidas por la estirpe de sexo contrario se origina un engrosamiento de las hifas especializadas para el cruzamiento sexual llamadas cigóforos. Los cigóforos de ambos sexos contactan y se entrelazan por parejas en el aire adoptando una disposición de tenazas en la que cada mitad está compuesta por la región distal del otro, el progamentagio. Una pared transversal tabica los ápices de cada progamentagio, separando una célula llamada gamentagio y la parte restante se llama suspensor. La fusión de dos gamentagios origina una sola célula, la cigospora, que contiene citoplasma y núcleos de ambas estirpes. La cigospora mide unos 0,5 mm de diámetro y está rodeada de unas apéndices negros procedentes de los suspensores. En la cigospora, una vez fusionados los núcleos haploides, se tiene que producir una meiosis y posteriormente mitosis para generar los núcleos de la germospora; al menos esto es lo que hipotetizó Hans Burgeff (1928). Esta discusión sobre si ocurre meiosis o mitosis en la cigospora siguen siendo objeto de debate

ya que parece que hay evidencias de ambas cosas (desarrollado en la sección 2.3 de esta introducción). La cigospora permanece en latencia durante meses antes de germinar produciendo un germosporangióforo, con su germosporangio en la parte apical conteniendo las germosporas. Las germosporas al germinar dan lugar al micelio vegetativo (Cerdá-Olmedo, 2001; Cerdá-Olmedo & Lipson, 1987b).

2.2.- Genómica de *Phycomyces blakesleeanus*.

La secuenciación del genoma de *Phycomyces* está ayudando a entender la base molecular de la sensibilidad a estímulos ambientales y está proporcionando información sobre la evolución de los genomas de hongos entre otras utilidades. El genoma de este hongo ha sido secuenciado por el Joint Genome Institute (Departamento de Energía, EEUU). La secuencia del genoma de *P. blakesleeanus* con los resultados de la anotación automática están disponibles en (<http://genome.jgi.doe.gov/Phybl2/Phybl2.home.html>). El genoma de este hongo ha sido secuenciado y ensamblado en 80 contigs que contienen 53,9 Mbp con una predicción de 16528 genes con una densidad de génica de 306,4 genes/ Mbp (Corrochano et al., 2016).

El hecho de tener el genoma secuenciado facilita las investigaciones en este hongo aunque todavía no se ha conseguido la transformación estable con ADN exógeno. Se ha intentado la introducción de ADN mediante diferentes técnicas, pero esto da lugar a una reacción por parte del hongo que degrada el ADN entrante y también el ADN propio dando lugar a la pérdida de viabilidad e inducción de mutaciones en los supervivientes (Obraztsova et al., 2004). Este hecho impide el uso de numerosas técnicas modernas de biología molecular que ya han sido aplicadas en otros hongos.

2.2.1 Duplicación genómica en el subfilo Mucoromycotina.

La secuenciación de los genomas de algunos cigomicetos, entre ellos, el de *P. blakesleeanus* y *M. circinelloides*, han revelado que éstos han sido moldeados por una duplicación del genoma rara vez observada en los hongos. En el análisis de estos genomas se ha observado la expansión de algunas familias de genes, incluyendo los que participan en la transducción de señales. Los genes duplicados se han especializado, como se evidencia, por ejemplo, por las diferencias de su regulación transcripcional por la luz. La duplicación génica ha ampliado el número de genes que participan en la fotorrecepción en *Phycomyces* y *Mucor*. La duplicación genómica y la posterior especialización pueden haber

proporcionado nuevas proteínas para incrementar el repertorio sensorial de estos hongos (Corrochano et al., 2016).

El incremento en los tamaños de los genomas de *Phycomyces blakesleeanus* (53,9 Mb) y *Mucor circinelloides* (36,6 Mb) es debido en parte a la gran cantidad de ADN repetitivo. La comparación de los genomas de estos hongos con el de otro cigomiceto, *Rhizopus delemar*, y otros hongos, sugiere que la duplicación génica ocurrió temprano en la evolución de la familia Mucoromycotina (Corrochano et al., 2016).

Algunas familias de genes, pero no todas de una categoría se expanden como ocurre con los genes implicados en fotorrecepción en estos hongos. Los genes que codifican para proteínas del tipo *White Collar* se han duplicado en *Phycomyces* y *Mucor*, aunque no lo hace el gen del criptocromo. También existen genes que codifican para proteínas que participan en la defensa del genoma a través de ARNi que no se han duplicado en estos hongos. La presencia de estos genes sugiere la existencia de una regulación mediada por ARNi en *Phycomyces* y *Rhizopus*, como ya ha sido descrito en *Mucor* (Nicolás et al., 2015). En definitiva, la duplicación génica ha proporcionado en estos cigomicetos los medios para mejorar la percepción y transducción de señales ambientales; consiguiendo una mejor adaptación al medio que les rodea (Corrochano et al., 2016)

2.3 Genética de *Phycomyces blakesleeanus*.

El análisis genético mendeliano es una potente herramienta disponible para investigar organismos eucariotas e incluye capacidades únicas para dirigir aspectos específicos sobre el comportamiento de los cromosomas. La habilidad para realizar cruces sexuales es particularmente importante en organismos que no han sido transformados genéticamente de manera exitosa, como es el caso de *Phycomyces blakesleeanus*. Gracias a los cruzamientos se consigue una batería de descendientes, cuyo análisis permite conocer diferentes aspectos de la genética de este hongo que incluyen el número de grupos de ligamiento, frecuencias de recombinación, etc. Se han aislado cientos de mutantes en *Phycomyces* aunque se han identificados muy pocos.

La recombinación y la meiosis en *Phycomyces* sigue siendo objeto de investigación desde los estudios realizados por Burgeff en 1912. A pesar de ser la especie más idónea para los estudios genéticos en la familia Mucoromycotina, los eventos genéticos durante los

cruzamientos siguen sin estar claros. En Metha et al., 2001 señalan que sus datos y otras relaciones de segregación son incompatibles con que exista un solo núcleo diploide que se somete a una reducción meiótica, siendo también las pruebas de meiosis en *Phycomyces* escasas. Metha et al. apuntan que no se da meiosis porque este proceso es simétrico y ordenado y en *Phycomyces* se producen frecuencias alélicas erráticas en un germosporangio. Por ello, defienden la hipótesis de que no hay meiosis, sino que los núcleos supervivientes diploides sufren repetidas divisiones mitóticas, en las que se producirían una frecuente recombinación mitótica y luego una haploidización permitiendo una progenie con núcleos haploides (Mehta & Cerdá-Olmedo, 2001).

Sin embargo, Chaudhary et al., 2013 sugieren que a pesar de no poder resolver completamente la naturaleza de los eventos de reducción genética dentro de la cigospora de *Phycomyces* confirman que ocurre recombinación entre los cromosomas aunque no mediante una “meiosis perfecta”. Estos autores proponen que la meiosis está influenciada por un pobre o inoportuno alineamiento de los cromosomas durante la meiosis I. Esto se basa en las relativamente altas tasas de recombinación (33,2 kb por cM) observadas en los cruzamientos (Chaudhary et al., 2013), pero que son consideradas escasas para la segregación de marcadores comparadas con lo que se obtiene con cruces entre estirpes con una mayor proporción de material genético compartido (Alvarez & Eslava, 1983b). Es decir, *Phycomyces* sufre una meiosis o tiene una frecuencia de recombinación mitótica de ordenes de magnitud mayor que otros eucariotas. Otro resultado que apoya la existencia de meiosis es que los genes del sexo de *Phycomyces*, *sexP* y *sexM*, están dentro de regiones idiomórficas de ADN rodeadas de secuencias de ADN conservadas (Idnurm & Heitman, 2005). La tercera evidencia de meiosis en *Phycomyces* es la presencia en su genoma de genes que codifican para proteínas, como por ejemplo, Dcm1, Spo11, Hop2 Mnd1, Msh5/ Msh5 cuyo papel en la meiosis está confirmado en otros organismos. Además, la frecuencia de recombinación observada en *Phycomyces* está al mismo nivel que la de otros hongos donde la meiosis está confirmada (Chaudhary et al., 2013).

Mediante análisis genético de descendientes de los diferentes cruzamientos y comprobando el ligamiento entre distintos marcadores a lo largo del genoma de *Phycomyces* se ha construido un mapa genético con 134 marcadores, mayoritariamente RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)-PCR. El análisis de los alelos en los

descendientes reveló entre 9 o 12 grupos de ligamientos. La frecuencia de recombinación entre los marcadores en cada grupo de ligamiento es de 1583,4 cM. Además, se estimó la frecuencia de recombinación media del genoma, revelando que 1 cM equivale a 33,2 kb. Los grupos de ligamientos en *Phycomyces* han sido numerados como: I, IIa, IIb, III, IV, Va, Vb, VI, VII, VIII, IXa y IXb (Chaudhary et al., 2013).

2.4 Fotobiología de *Phycomyces blakesleeanus*.

Phycomyces es capaz de responder a diferentes estímulos ambientales tales como la luz, la gravedad, el viento, la presión, las radiaciones ionizantes y la presencia de obstáculos (evitación) . Este organismo tiene la capacidad de modificar la velocidad y dirección de crecimiento de su cuerpo fructífero (esporangióforos) para responder a los diferentes estímulos (Cerdá-Olmedo, 2001). Los esporangióforos tienen tropismo positivo a la luz azul, radiación UV cercano, viento y presión, y a la radiación de 310 nm de longitud de onda (Martín-Rojas et al., 1995); mientras que presentan tropismo negativo a la presencia de obstáculos (Meyer et al., 1987) y la gravedad (Eibel et al., 2000; Galland et al., 2004; Grolig et al., 2004). Las respuestas miceliares a la luz más investigadas son la fotomorfogénesis y la fotocarotenogénesis. La fotomorfogénesis es el efecto de la luz sobre la formación y el desarrollo de los esporangióforos. La luz regula la formación de los dos tipos de esporangióforos que se originan en *Phycomyces*, macróforos y micróforos (Corrochano & Cerdá-Olmedo, 1992; Thornton, 1972). La luz azul estimula la producción de macróforos e inhibe la de micróforos (Corrochano & Cerdá-Olmedo, 1992). La capacidad de movimiento del macróforo se explicaría en la naturaleza como una necesidad de dispersión de las esporas ya que las esporas de *Phycomyces* a diferencia de las de otros hongos no son volátiles. Por otro lado, la aparición de micróforos durante el crecimiento en la oscuridad es una alternativa energéticamente económica de dispersión cuando no existe una posibilidad de dispersión a un entorno iluminado (Cerdá-Olmedo, 2001). La fotocarotenogénesis es el efecto de la luz sobre la síntesis del pigmento amarillo β -caroteno. La presencia de luz azul incrementa la cantidad de carotenos acumulados en el micelio (Bejarano et al., 1991; Bergman et al., 1973).

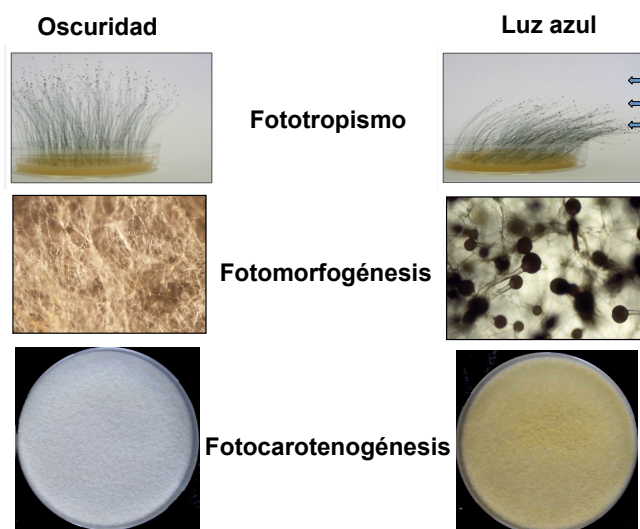


Figura I.8: Ejemplos de fotorrespuestas de *Phycomyces*.

2.4.1 Fototropismo

El fototropismo en hongos ha sido investigado en detalle usando como modelo el cuerpo fructífero de *Phycomyces*, el esporangióforo (Bergman et al., 1969; Cerdá-Olmedo, 2001; Cerdá-Olmedo & Lipson, 1987a). El fototropismo consiste en un crecimiento dirigido del esporangióforo hacia la luz. La luz más efectiva para este comportamiento es la luz azul (Galland & Lipson, 1985a). *Phycomyces* es muy sensible a la luz y el fototropismo ocurre en el intervalo de luz entre 10^{-9} y 10 W/m^2 (Galland, 2001) gracias a la acción de dos fotosistemas optimizados para operar a diferentes intensidades de luz (Galland & Lipson, 1987).

El esporangióforo reacciona a cambios en la intensidad de luz (fotomecismo) (Cerdá-Olmedo, 1977; Cerdá-Olmedo & Lipson, 1987a; Delbrück & Reichardt, 1956), y en ausencia de cambios, adopta una velocidad de crecimiento estándar de $1 \mu\text{m/s}$ (Cerdá-Olmedo, 2001). Una subida en la intensidad de luz produce una aceleración en el crecimiento del esporangióforo. Esta respuesta es transitoria, ya que a los 30 minutos del cambio de intensidad, la velocidad de crecimiento vuelve a ser la misma que antes del cambio. Esto es debido a un proceso de adaptación a la intensidad de luz (Wenzler et al., 2001).

2.4.1.1 Fotorreceptores.

El genoma de *Phycomyces* contiene tres genes del tipo *wc-1* y cuatro genes del tipo *wc-2*. Los genes homólogos de *wc-1* se denominan: *madA*, *wcoA* y *wcoB*; y los genes homólogos de *wc-2* se denominan *madB*, *wctB*, *wctC* y *wctD* (Idnurm et al., 2006; Sanz

et al., 2009). Estos genes se originaron mediante eventos de duplicación génica que ocurrieron muy temprano en el linaje evolutivo de los cigomicetos y que no han sido observados en otros grupos de hongos (Sanz et al., 2009).

Como en *Neurospora*, las proteínas MadA y WcoA presentan un dominio de unión a flavina (LOV), dos dominios de interacción entre proteínas (PAS) y un dominio dedo de zinc. La proteína WcoB posee el dominio LOV, los dos dominios PAS pero carece del dominio dedo de zinc. El gen *madA* se transcribe en oscuridad y es ligeramente reprimible por luz. El gen *wcoA*, por el contrario, se induce por la luz, lo que sugiere que la proteína WcoA podría estar implicada en las respuestas a la luz de alta intensidad (Idnurm et al., 2006); mientras que *wcoB* apenas es fotoinducible (Sanz et al., 2009).

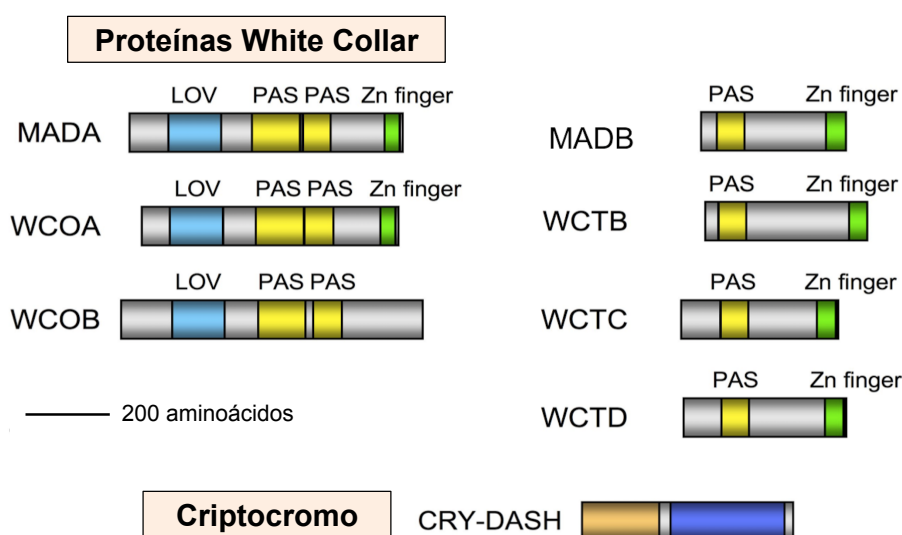


Figura I.9: Fotorreceptores de *Phycomyces*.

Las proteínas parecidas a WC-2 de *N. crassa*: MadB, WctB, WctC y WctD presentan un dominio PAS y un dominio dedo de zinc. El gen *madB*, al igual que *madA*, se transcribe en oscuridad y se reprime por luz. El gen *wctC* tampoco se induce por luz. En cambio, los genes *wctB* y *wctD* son fotoinducibles (entre 100-300 veces más transcripción en luz que en oscuridad). De todos los genes *wc*, los genes más importantes son *madA* y *madB* ya que los mutantes en estos genes tienen alteradas todas las respuestas a la luz (Bergman et al., 1973; Idnurm et al., 2006; Sanz et al., 2009). También presenta un gen que codifica para el criptocromo, *cryA*, que pertenece a los criptocromos de la familia cry-DASH y que está explicado en la sección 1.2.2 de esta introducción.

Existen tres mutaciones localizadas en el gen *madA*, en los mutantes A893, A895, C21 y C47. Las estirpes A893 y A895 presentan un codón de parada prematura de la traducción causado por un cambio de nucleótido TGG a TGA, que resulta en una proteína que es 227 aminoácidos más corta que proteína MadA silvestre y que carece de un dominio PAS y del dominio dedo de zinc. En la estirpe C47 un cambio de nucleótido AAC por AGC causa una sustitución de una asparragina muy conservada del dominio LOV por una serina (N132S). Esta asparragina participa en la formación del puente de hidrógeno con la flavina y el agua (Crosson & Moffat, 2001). En la estirpe C21, un cambio de nucleótido G/GTAATA a G/ATAATA en el último intrón bloquea el procesamiento correcto del ARNm y provoca un codón de parada prematura (Idnurm et al., 2006).

En el gen *madB* sólo se ha localizado una mutación en el nucleótido 907 que conlleva una transición de G a A y que es el mismo alelo en las estirpes C109, C111 y C112. Este cambio evita el procesamiento correcto del primer intrón, produciendo un ARNm de mayor longitud que da lugar a una proteína truncada de 327 aminoácidos. La proteína mutante carece del dominio dedo de zinc (Sanz et al., 2009).

Las proteínas MadA y MadB interactúan formando un complejo llamado complejo Mad que es homólogo al complejo WC de *N. crassa*. El complejo Mad es el complejo fotorreceptor principal en *Phycomyces*. Ensayos de doble híbrido y expresión en *E. coli* de todas las proteínas WC de *Phycomyces* permitieron observar la interacción entre MadA y MadB (Sanz et al., 2009). También se ha observado que las mutaciones en los genes *madA* o *madB* reducen la fotoactivación de los genes *wc* que son fotoinducibles, como *wcoA*, *wcoB*, *wctB* y *wctD*. Los dominios presentes en MadA y MadB sugieren que el complejo Mad debe ser necesario para la activación de la transcripción por luz. Es posible que las otras proteínas del tipo WC-1, WcoA y WcoB, sirvan como fotorreceptores secundarios optimizados para distintas intensidades de luz o en distintos estadios del desarrollo. Estos resultados apoyan la idea de que el complejo Mad de *Phycomyces* funciona como un factor de transcripción regulado por luz.

Se ha propuesto que el complejo Mad estaría disponible en oscuridad, para que cuando llegue la luz dicho complejo esté preparado para actuar. La exposición a baja intensidad de luz promueven la activación de los genes *wcoA*, *wctB* y *wctD* para proveer de nuevos fotorreceptores que podrían dedicarse a la recepción de dicha luz. Por el

contrario, altas intensidades de luz activarían al gen *wcoB* para de esta manera percibir fotones de alta intensidad. Sin embargo, la diferencia en los umbrales de activación de los genes *wc* sugiere que proteínas fotorreceptoras adicionales, como WcoA y WcoB, colaborarían en la oscuridad con el complejo Mad para activar la transcripción de genes a diferentes intensidades de luz (Sanz et al., 2009).

El sistema de fotorrecepción a la luz de *Phycomyces* es el más complejo descrito en un hongo, ya que se han descritos dos fotosistemas optimizados para la recepción de la luz de baja y alta intensidad (Corrochano et al., 1988; Galland & Lipson, 1987). Además existen algunas observaciones que permiten predecir que el mecanismo de fotorrecepción de *Phycomyces* no es igual al de *Neurospora*, como por ejemplo, la fotoadaptación. La fotoadaptación, activación transitoria de la transcripción, parece deberse a la pérdida de sensibilidad del fotorreceptor ya que desaparece con cambios en la intensidad de luz (Arpaia et al., 1999; Schwerdtfeger & Linden, 2001). En *Phycomyces*, por el contrario, la adaptación ocurre por una pérdida en la capacidad de transcribir genes tras exposiciones prolongadas y no por cambios en la intensidad de la luz (Rodríguez-Romero & Corrochano, 2006).

2.4.1.2 Mutantes del fototropismo.

El análisis genético del fototropismo en *Phycomyces* se inició con el aislamiento de los mutantes *mad* que permitió el primer esbozo de la ruta de transducción sensorial en este hongo (Bergman et al., 1973). El nombre para el genotipo *mad* fue elegido en honor al premio Nobel Max Delbrück por su papel promoviendo *Phycomyces* como organismo modelo para investigar la biología sensorial (Fischer & Lipson, 1988). Se identificaron un total de diez genes *mad*, desde *madA* a *madJ* (Campuzano et al., 1995; Orejas et al., 1987). Estos genes *mad* se clasifican como genes *mad* del tipo 1 que incluyen a *madA*, *madB*, *madC* y *madI* y genes *mad* del tipo 2 que incluyen el resto de mutantes *mad*. Los genes *mad* del tipo 1 están afectados en las fotorrespuestas pero no en otros tropismos del esporangioforo y muestran una disminución en la sensibilidad a la luz azul (Alvarez et al., 1983). También se les denomina “ciegos a la noche”, ya que estos mutantes son capaces de responder a la luz a altas intensidades pero no responden a una intensidad baja de luz. Mutaciones en *madA* o *madB* no sólo afectan al fototropismo sino que también perjudican las demás fotorrespuestas del hongo, como son la fotomorfogénesis, fotomecismo y la

fotocarotenogénesis ya que las proteínas MadA y MadB son las integrantes del complejo Mad, el principal complejo fotorreceptor de *Phycomyces* (Sanz et al., 2009). Los mutantes alterados en el gen *madC* sólo están afectados en el fototropismo. La caracterización del gen *madC* será tratada en el capítulo 1 de esta tesis (Bergman et al., 1973; Corrochano & Cerdá-Olmedo, 1992).

Los mutantes *mad* de tipo 2 están alterados en el fototropismo del esporangioforo y en otras respuestas del esporangioforo como el gravitropismo y la evitación (Alvarez & Eslava, 1983a; Campuzano et al., 1996). El mutante *madH* es el único hipertrópico ya que es capaz de mover los esporangioforos más rápidamente que el silvestre (López-Díaz & Lipson, 1983). Existen razones para creer que los productos de los genes *mad* de tipo 2 están implicados en la regulación del crecimiento de la pared celular en la zona de crecimiento. Esto implica una debilitación local de las fibras de quitina debido a la acción de las quitinasas, lo cual resultará en una extensión longitudinal pasiva, y el refuerzo posterior de nueva síntesis de quitina (Cerdá-Olmedo, 2001).

En *Phycomyces*, la radiación ultravioleta es absorbida por los cromóforos que absorben la luz azul y requieren los productos de los genes *mad* para la acción, pero esto no explica las direcciones opuestas fototrópicas de la luz azul (fototropismo positivo) y la ultravioleta C (fototropismo negativo) (Curry & Gruen, 1957; Galland, 1998). La fuerte capacidad del ácido gálico presente en los esporangioforos para absorber luz ultravioleta C no es una explicación debido a que un mutante que no presenta ácido gálico se aleja de la radiación ultravioleta (Weinkove et al., 1998). Por lo tanto, la existencia de productos de genes específicos para la respuesta negativa se confirma por el aislamiento de mutantes *uvi* que reaccionan normalmente a la luz azul, pero defectuosamente a la radiación ultravioleta C (Campuzano et al., 1994; Martín-Rojas et al., 1995). Este resultado indica la existencia de dos mecanismos para el tropismo, uno para la radiación UV y otro para la luz azul (Cerdá-Olmedo, 2001; Martín-Rojas et al., 1995).

2.4.2 Fotomorfogénesis en *Phycomyces*.

Phycomyces blakesleeanus desarrolla dos tipos de esporangioforos de diferente tamaño, macróforos y micróforos. Estas estructuras se desarrollan para llevar a cabo la reproducción asexual cuyo proceso se denomina forogénesis (Corrochano & Cerdá-Olmedo, 1992). La luz azul estimula la macroforogénesis e inhibe a los microforogénesis. El efecto de la luz azul en el desarrollo de los esporangioforos sigue una curva estímulo-

respuesta en dos etapas, lo que sugiere la presencia de diferentes fotosistemas optimizados para funcionar a diferentes intensidades de luz (Corrochano & Cerdá-Olmedo, 1990a). Además, diferencias en el espectro de acción para fotomicroforogénesis y fotomacroforogénesis sugieren la actividad de fotorreceptores específicos para cada respuesta (Corrochano et al., 1988). Este tipo de respuesta con dos componentes es común a todas las fotorrespuestas de *Phycomyces*, y sugiere la existencia de dos sistemas de fotorrecepción, uno sensible a alta intensidad y otro para baja intensidad cuyos umbrales abarcan desde 10^{-4} hasta 1 J/m^2 para la luz azul (Corrochano & Cerdá-Olmedo, 1990b; Flores et al., 1998).

Los macróforos pueden llegar a medir varios centímetros de longitud, su esporangio mide $500 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro y contiene alrededor de 10^5 esporas. Los micróforos miden alrededor de 1 milímetro de longitud y su esporangio $100 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro con unas 10^3 esporas (Gutierrez-Corona & Cerdá-Olmedo, 1985).

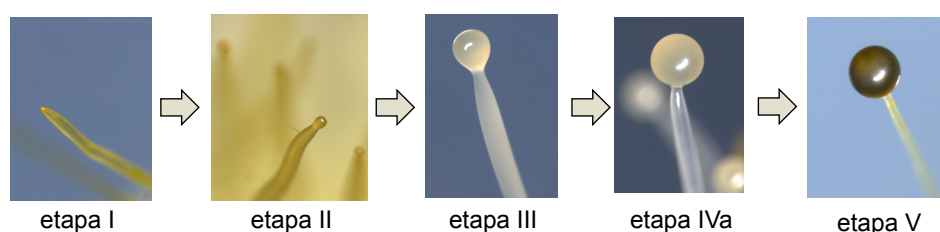


Figura I.10: Etapas del desarrollo del esporangióforo en *Phycomyces*.

2.4.3 Fotocarotenogénesis en *Phycomyces*.

Los carotenoides son pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza, producidos por bacterias, hongos, algas y plantas. Los derivados de los carotenoides tienen gran importancia en diferentes procesos como la visión, nutrición, crecimiento celular y desarrollo (Sanz et al., 2011a). En organismos fotosintéticos, los carotenoides participan en la recolección de luz y en la fotoprotección de la maquinaria fotosintética (Domonkos et al., 2013). Los carotenoides en plantas también tienen función como pigmentos accesorios en la fotosíntesis y proporcionan colores llamativos a flores y frutos para atraer a los animales y facilitar la dispersión de las semillas. Además los carotenoides son responsables de los colores presentes en algunos animales, y juegan un papel esencial en vertebrados como fuente de retinoides, tales como el retinal y el ácido retinoico (Zeilinger et al., 2015). Los animales son incapaces de sintetizar carotenoides y lo obtienen con la

dieta; con la excepción de algunos áfidos o ácaros que son capaces de sintetizarlos gracias a la transferencia horizontal desde un hongo patógeno o simbiote (Altincicek et al., 2012; Moran & Jarvik, 2010).

En humanos, el consumo de carotenoides ha sido asociado a los diferentes efectos beneficiosos para la salud, incluyendo la reducción en la incidencia de algunas enfermedades (Krinsky & Johnson, 2005; Rao & Rao, 2007; Stahl & Sies, 2003). El caroteno más importante es el β -caroteno, tiene propiedades antioxidantes y es el precursor del retinal (aldehído de la vitamina A o retinol) y del ácido retinoico. Otros carotenos como el licopeno poseen una elevada capacidad antioxidante, y su ingestión reduce el riesgo de cáncer y cierto problemas cardiovasculares (Hadley et al., 2002).

A nivel biotecnológico, los carotenoides son importantes ya que se utilizan como ingredientes activos en las industrias cosméticas y alimentarias no sólo por sus propiedades químicas sino también por sus llamativos colores. Cada vez se utiliza más en productos de belleza, como colorante alimenticio o en alimentos pobres en carotenos (Avalos & Cerdá-Olmedo, 2004).

Muchos hongos sintetizan carotenoides, y en algunos, la bioquímica y genética de su biosíntesis han sido objeto de estudio. Los carotenoides mejor estudiados son el β -caroteno, neurosporaxantina y astaxantina, mientras existe menos información sobre la producción de otros carotenoides como son las xantofilas. El β -caroteno es el caroteno más extendido en la naturaleza (Zeilinger et al., 2015) y es el principal producto final de la vía de carotenogénesis de muchos hongos, entre ellos los mucorales *Phycomyces blakesleeanus* (Bejarano et al., 1991), *Blakeslea trispora* (Quiles-Rosillo et al., 2005) y *Mucor circinelloides* (Navarro et al., 1995). Además de los mucorales, la producción de β -caroteno ha sido también descrita en otros grupos taxonómicos, incluyendo basidiomicetos como *Rhodospiridium sp.* (de Miguel T et al., 1997), *Sclerotium rolfsii* (Georgiou CD et al., 2001a), *Sclerotinia sclerotiorum* (Georgiou CD et al., 2001b), *Sporidiobolus pararoseus* (Han et al., 2012), *Ustilago maydis* (Estrada et al., 2009) y algunas especies de *Ustilago* (Will et al., 1984; 1985); y en ascomicetos como *Aspergillus giganteus* (El-Jack et al., 1988), *Cercospora nicotianae* (Daub & Payne, 1989), *Neurospora crassa* (Harding & Turner, 1981), *Fusarium fujikuroi* (Avalos & Cerdá-Olmedo, 1987) y *Penicillium sp* (Han et al., 2005). Sin embargo, el β -caroteno es una molécula

intermediaria en la síntesis de otros carotenoides en muchas especies de hongos (Zeilinger et al., 2015).

2.4.3.1 Biosíntesis de β -caroteno en *Phycomyces*.

La biosíntesis de β -caroteno comienza con la condensación de dos moléculas de geranilgeranil pirofosfato (GGPP) para formar un compuesto incoloro llamada fitoeno, a través de un intermediario, el pirofosfato de prefitoeno (Altman LJ et al., 1972). Esta doble reacción es catalizada por la fitoeno sintasa CarA que corresponde al dominio A del gen *carRA* (Arrach et al., 2001; Sanz et al., 2011a; Torres-Martínez et al., 1980). A partir de fitoeno, ocurren cuatro deshidrogenaciones consecutivas para dar lugar a licopeno, un compuesto rojizo; y posteriormente dos β -ciclaciones para originar β -caroteno. Las cuatros deshidrogenaciones están catalizadas por cuatro moléculas de la enzima fitoeno deshidrogenasa, codificada por el gen *carB*. Los intermediarios de estas reacciones son fitoflueno, ζ -caroteno, y neurosporeno, hasta llegar a licopeno (Aragon et al., 1976; Eslava et al., 1974; Sanz et al., 2011a). Posteriormente, la molécula de licopeno sufre una primera ciclación en un extremo originando γ -caroteno y una segunda ciclación en el otro extremo de la molécula originando el producto final de la ruta que es el β -caroteno. Estas reacciones son catalizadas por la enzima licopeno ciclasa CarR, producto del dominio R del gen *carRA* (Aragon et al., 1976; Eslava & Cerdá-Olmedo, 1974; la Guardia et al., 1971; Torres-Martínez et al., 1980).

En definitiva, la biosíntesis de β -caroteno en *Phycomyces* depende de dos genes estructurales que codifican para tres proteínas que actúan formando un agregado enzimático (Aragon et al., 1976; la Guardia et al., 1971): el gen *carB* para la deshidrogenasa de fitoeno (Eslava & Cerdá-Olmedo, 1974; Ruiz-Hidalgo et al., 1997) y el gen bifuncional *carRA* para la ciclasa de licopeno y la sintasa de fitoeno (Torres-Martínez et al., 1980). Ambos genes se encuentran ligados en los genomas de *Phycomyces* (Arrach et al., 2001; Roncero & Cerdá-Olmedo, 1982), *Mucor* (Velayos et al., 2000) y *Blakeslea* (Rodríguez-Sáiz et al., 2004). La biosíntesis de β -caroteno se lleva a cabo en un complejo enzimático que contiene siete moléculas con tres actividades catalíticas diferentes codificadas por los genes *carB* y *carRA* (Aragon et al., 1976; Candau et al., 1991; la Guardia et al., 1971; Sanz et al., 2002). En *Phycomyces* toda la síntesis del β -caroteno desde acetato ocurre en compartimentos especializados, independientes de los de otros terpenoides, como los esteroides y la ubiquinona (Kuzina & Cerdá-Olmedo,

2007).

En este punto, la molécula de β -caroteno es cortada por la oxigenasa CarS, codificada por el gen *carS* que es reprimido por luz y activado por la interacción sexual (Medina et al., 2011; Tagua et al., 2012), formando moléculas C₂₅ y C₁₅. El C₂₅ se corta posteriormente por la oxigenasa AcaA, que se activa por la interacción sexual (Medina et al., 2011), produciendo moléculas C₇ y C₁₈. Las moléculas C₁₅, C₇ y C₁₈ forman las familias de apocarotenoides de los monociclofarnesoides, los metilhexanos y los trisporoides, respectivamente. Estos apocarotenoides actúan como las feromonas sexuales de los cigomicetos. La oxigenasa CarS regula la ruta de biosíntesis de β -caroteno mediante la producción de un apocarotenoide regulador que modifica la actividad de CarA (Tagua et al., 2012).

La síntesis de β -caroteno en *Phycomyces* está regulada por varios estímulos ambientales: estimulación sexual (Barnett et al., 1956), por la presencia de ciertos productos químicos como el retinol (Eslava et al., 1974) o el ftalato de dimetilo (Bejarano et al., 1988; Cerdá-Olmedo & Hüttermann, 1986) y por la luz (Bejarano et al., 1991; Bergman et al., 1973).

El estudio de los mutantes de la carotenogénesis ha permitido obtener un modelo general de la biosíntesis de β -caroteno y su regulación (Bejarano & Cerdá-Olmedo, 1988; Govind & Cerdá-Olmedo, 1986; Mehta & Cerdá-Olmedo, 2001; Mehta et al., 1997; Murillo & Cerdá-Olmedo, 1976). Además de los dos genes estructurales, *carB* y *carRA*, existen seis genes reguladores: *carC* (Revuelta & Eslava, 1983), *carD* (Salgado et al., 1989), *carE* (la Concha Conejero A, 1983), *carF* (Mehta et al., 1997), *carI* (Roncero & Cerdá-Olmedo, 1982) y *carS* (Murillo & Cerd Olmedo, 1976). El gen *carRA*, además de ser responsable de la síntesis de dos proteínas estructurales, tiene también una función reguladora (Arrach et al., 2001; Murillo et al., 1981; Torres-Martínez et al., 1980). Se ha comprobado que los compuestos apocarotenogénicos que presentan la estructura química anillo- β , como β -caroteno o retinol, inhiben la función de la proteína CarA (fitoenosintasa) (Arrach et al., 2001; Bejarano et al., 1988; Roncero & Cerdá-Olmedo, 1982). La combinación de las distintas mutaciones pueden tener un efecto sinérgico; llegando a aumentar hasta doscientas veces la cantidad de caroteno con respecto a la estirpe silvestre (Cerdá-Olmedo, 2001; Cerdá-Olmedo & Hüttermann, 1986; Murillo et al., n.d.). Los

mutantes *carC* (Revuelta & Eslava, 1983), cuyo gen se ha propuesto que codifica para una geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS) (Tagua, 2012), contienen menos cantidad de caroteno que la estirpe silvestre. Los mutantes *carI* y *carA*, los cuales tienen afectados el dominio A del gen *carRA*, presentan una disminución de la cantidad de caroteno y son insensibles a los agentes químicos carotenogénicos (Roncero & Cerdá-Olmedo, 1982). Por el contrario, los mutantes *carS* presentan hasta 50 veces más β -caroteno que la estirpe silvestre creciendo en oscuridad (Murillo & Cerd Olmedo, 1976; Tagua et al., 2012). Los mutantes *carS*, cuyo gen codifica para una oxigenasa de β -caroteno, no pueden estimular a otra estirpes de sexo contrario debido a que no pueden romper el β -caroteno y producir apocarotenoides, las hormonas sexuales de *Phycomyces* (Medina et al., 2011; Polaino et al., 2012; Tagua et al., 2012). En definitiva, el fenotipo sexual de los mutantes *carB*, *carR* (no producen β -caroteno) y *carS* es el mismo: ellos responden sexualmente a sus compañeros pero ellos no son capaces de estimularlos (Kuzina & Cerdá-Olmedo, 2006).

Los productos de los genes *carD* y *carS* participan en la regulación de la biosíntesis de carotenos por producto final; ya que los niveles de carotenos son altos en oscuridad pero aun así aumentan tras una inducción por luz (Cerdá-Olmedo & Lipson, 1987a). El gen *carF* no está implicado en la regulación por producto final, y sus niveles de carotenos en los mutantes no aumentan por efecto de la luz y sus mutaciones ejercen un efecto sinérgico junto con *carS* (Mehta et al., 1997). Los mutantes *carS*, *carD* y *carF* son superproductores de carotenos (Mehta et al., 1997; Murillo & Cerd Olmedo, 1976; Salgado et al., 1989), aunque la máxima producción de β -caroteno se da en el doble mutante *carF carS*, que contiene 100 veces más β -caroteno que la estirpe silvestre. Existe una estirpe S444, que deriva de C115 y que posee el alelo *carS42*, y otra mutación no identificada, acumula más que un mutante *carF carS* pero con un crecimiento muy lento, una morfología defectuosa y un extraño comportamiento genético (Mehta et al., 1997).

1 kb

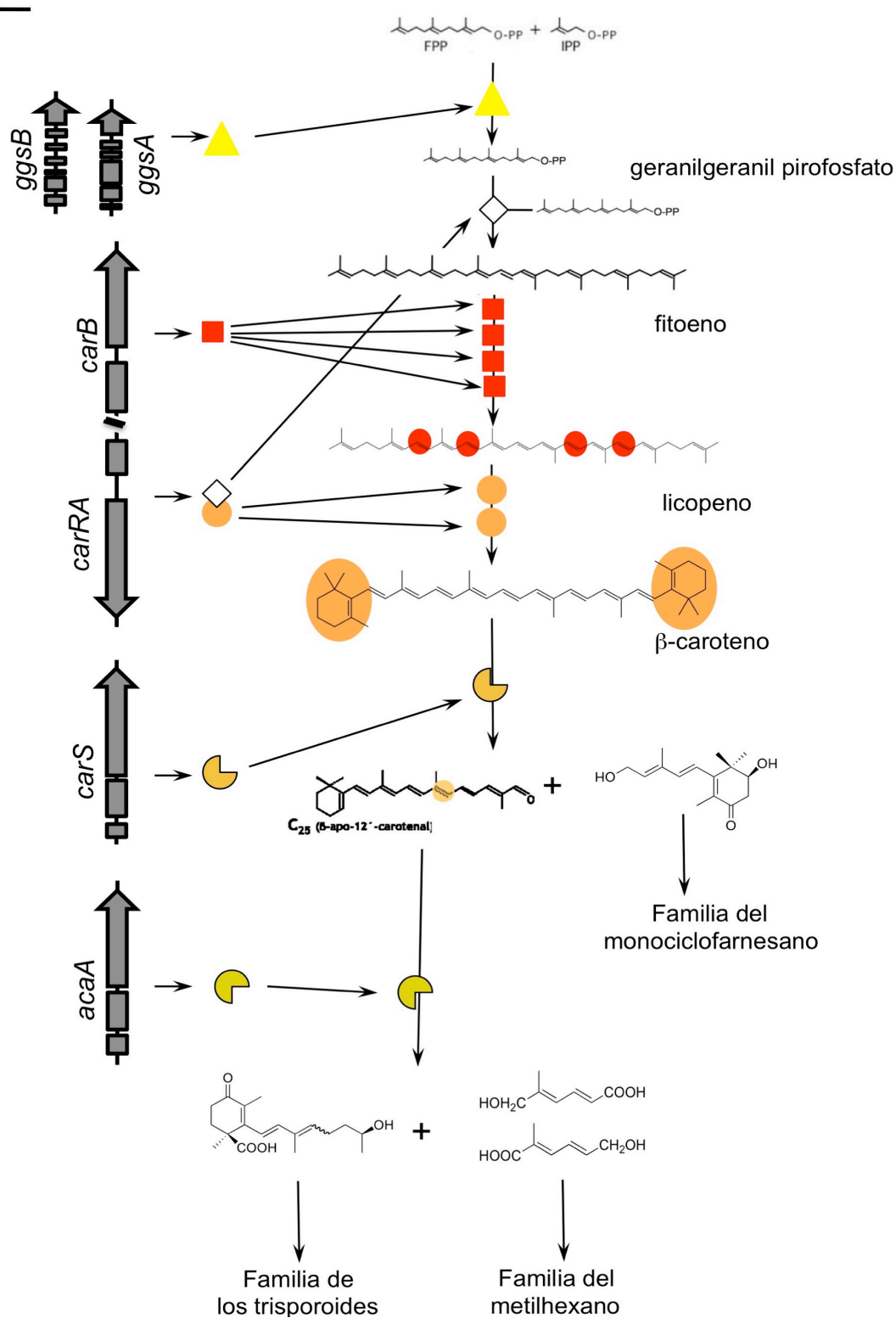


Figura I.11: Modelo de la síntesis de carotenoides y apocarotenoides en *Phycomyces blakesleeanus* (Medina et al., 2011; Polaino et al., 2010; 2012; Tagua et al., 2012).

OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis doctoral han sido profundizar en el estudio sobre la fotobiología del hongo *Phycomyces blakesleeanus* desde la transcripción génica hasta el estudio de la acumulación y función de las proteínas implicadas en la respuesta a la luz.

Por ello, marcamos unos objetivos generales que se resumen de la siguiente manera:

1.- Investigar el papel del fotorreceptor WcoB en la fotobiología de *Phycomyces* abordando desde su regulación por luz hasta el estudio de las proteínas con las que interacciona.

2.- Identificación de *madC* como una proteína que participa en la ruta de transducción sensorial y su implicación en el fototropismo del esporangióforo de *P. blakesleeanus*.

3.- Caracterizar el ligamiento genético entre las mutaciones en el gen *ggsA* con el fenotipo *carC* e investigar la actividad enzimática GGPPS de las proteínas CarC y GgsB usando sistemas heterólogos.

Capítulo 1

El papel del fotorreceptor WcoB en la fotobiología
de *Phycomyces blakesleeanus*

1.1 Introducción

Phycomyces contiene en su genoma dos genes, *madA* y *madB*, homólogos de *wc-1* y *wc-2* de *Neurospora crassa*, respectivamente. Las proteínas MadA y MadB interaccionan físicamente formando el complejo fotorreceptor principal de *Phycomyces*, el complejo Mad. El complejo Mad actúa como factor de transcripción regulando la expresión de genes fotoinducibles, el fototropismo y otras respuestas a la luz (Sanz et al., 2009). *Phycomyces* tiene varios genes *wc*. En total, *Phycomyces* tiene tres genes homólogos de *wc-1* de *N. crassa* denominados *madA*, *wcoA* y *wcoB*; y cuatro genes homólogos de *wc-2* de *N. crassa* denominados *madB*, *wctB*, *wctC* y *wctD* (Idnurm et al., 2006; Sanz et al., 2009). Los genes *madA* y *madB* se reprimen por la luz, sugiriendo que estas proteínas están presentes en la oscuridad preparadas para activar la transcripción de genes en luz. La activación por luz azul de *wcoA*, *wcoB*, *wctB* y *wctD* sugiere que los correspondientes productos génicos debe ser necesarios después de una exposición inicial a la luz o para responder a intensidades altas de luz. La activación de la transcripción de los genes *wctB* y *wctD* por la luz es muy importante (180 y 250 veces, respectivamente, respecto a la oscuridad) (Sanz et al., 2009). Por el contrario, la transcripción de *madA*, *madB* y *wctC* no se induce por luz (Sanz et al., 2009). Las exposiciones a luz azul de diferentes duraciones han mostrado que la máxima acumulación de ARNm para *wcoA*, *wcoB*, *wctB* y *wctD* ocurren después de 15-30 minutos de exposición, aunque la fotoactivación se ha observado después de los primeros 5 minutos de exposición. Largas exposiciones a la luz reducen la acumulación de ARNm pero la fotoactivación génica se observó hasta después de 2 horas de exposición (Sanz et al., 2009). Los umbrales para la fotoactivación de los genes *wc* de *Phycomyces* son 10^{-4} - 10^{-5} J/m²; excepto para el gen *wcoB* cuyo umbral de fotoactivación es 1 J/m² similar al del gen de choque térmico *hspA* pero notablemente superior al del resto de genes *wc* (Rodríguez-Romero & Corrochano, 2006; Sanz et al., 2009). Para la regulación por la luz de los genes *wc* de *Phycomyces* es necesario el complejo Mad (Sanz et al., 2009).

La proteína WcoB de *Phycomyces* es homóloga a MCWC-1b de *Mucor*. Estas proteínas presentan un dominio LOV y dos dominios PAS típicos de las proteínas WC-1, pero carecen del dominio dedo de zinc (Sanz et al., 2009; Silva et al., 2006). MCWC-1b ha sido estudiada en detalle en *Mucor* (Silva et al., 2008) mientras que WcoB de *Phycomyces* se estudiará en este capítulo. Actualmente no se ha encontrado ningún

mutante en el gen *wcoB* de *Phycomyces*, de ahí la importancia de conocer la función de su homólogo en *Mucor*.

Mucor circinelloides es un organismo en el que se ha conseguido una aproximación molecular para estudiar su fotobiología ya que hay disponibles herramientas moleculares para manipular su genoma (Gutiérrez et al., 2011). *Mucor* tiene tres genes homólogos de *wc-1* de *N. crassa*, conocidos como *mcwc-1a*, *mcwc-1b* y *mcwc-1c* (Silva et al., 2006). Estos tres genes participan en diferentes respuestas a la luz. El gen *mcwc-1a* es necesario para el fototropismo positivo de los esporangióforos, el gen *mcwc-1c* es necesario para la inducción de la carotenogénesis por la luz, mientras que el producto del gen *mcwc-1b* actúa como activador de la carotenogénesis (Silva et al., 2008). Sin embargo, mientras que *mcwc-1a* y *mcwc-1b* no se inducen por luz, la expresión de *mcwc-1c* se induce mucho por la luz y esta activación depende parcialmente de *mcwc-1a* (Silva et al., 2006). Otro gen implicado en la carotenogénesis de *Mucor* es *crgA* que codifica para una E3 ligasa de ubiquitina (Navarro et al., 1995). CrgA contiene dos dominios RING-finger en el extremo amino (uno de ellos no canónico), un dominio LON interrumpido por tres regiones ricas en glutamina y un dominio de isoprenilación en el extremo carboxilo. El dominio más importante es el RING-finger que define a la familia de proteínas de las E3 ligasas, y que se encarga de la ubiquitinación de proteínas en un proceso por el cual se marcan proteínas para su degradación en el proteasoma (Weissman et al., 2011). La longitud de las cadenas de ubiquitina y el tipo de unión entre ubiquitinas determina el destino de la proteína diana. Las proteínas que contienen cadenas de poliubiquitina compuestas al menos por cuatro unidades son degradadas en el proteasoma 26S. Sin embargo, la presencia de cortas cadenas de poliubiquitinas o ubiquitinaciones no canónicas parecen estar implicadas en una variedad de procesos independientes de proteólisis, tales como, reparación de ADN, transducción de señales, regulación transcripcional y endocitosis (Aguilar & Wendland, 2003; Conaway et al., 2002; Welchman et al., 2005). El gen *crgA* no usa el triplete AUG como iniciador de la traducción (Murcia-Flores et al., 2007). Análisis mutacionales indican que el codón GUG, localizado 204 nucleótidos aguas arriba del primer AUG en fase, es esencial para la traducción de CrgA y es utilizado como el único codón de iniciación de la proteína; una situación inusual que se ha descrito en eucariotas superiores para proteínas reguladoras, como factores de transcripción (Riechmann et al., 1999). CrgA actúa como regulador

negativo de la carotenogénesis ya que los mutantes nulos para este gen acumulan altos niveles de carotenos en oscuridad en comparación a los de la estirpe silvestre en luz (Navarro et al., 2001). Estos altos niveles de carotenos están relacionados con un aumento de los niveles de ARNm de los genes de la carotenogénesis *carB* y *carRP* que son activados por MCWC-1b. CrgA está implicado en la mono y diubiquitilación independiente de proteólisis de MCWC-1b provocando su inactivación, y por consiguiente, la disminución en la producción de carotenos (Silva et al., 2008). *Mucor* posee otro gen parecido a *crgA* que se denomina *crgB*. La expresión de *crgB* se activa por luz, al igual que *crgA*, y se reprime por *crgA*. El gen *crgB* parece jugar un papel esencial en la viabilidad de *Mucor* ya que no se han podido obtener mutantes nulos de este gen en forma homocariote (Gómez-Mateo, 2005).

Phycomyces blakesleeanus contiene en su genoma cuatro genes *crg* que son similares a *crgA* de *Mucor*. Dado a que *Mucor* y *Phycomyces* están relacionados filogenéticamente es posible que las proteínas Crg de *Phycomyces* puedan regular la biosíntesis de carotenos mediante un mecanismo similar. Sin embargo, se ha comprobado que los genes *crg* de *Phycomyces* no complementan del todo la ausencia de *crgA* en *Mucor*, aunque se ha observado una complementación parcial en algunos casos. A pesar de su similitud en las secuencias de proteínas es posible que los genes *crg* de *Phycomyces* no participen en la regulación de la biosíntesis de carotenos como en *Mucor*. La presencia de dominios conservados en las proteínas Crg de *Phycomyces* sugieren que actúan como ligasas de ubiquitina pero su papel exacto en la biología de *Phycomyces* no está todavía claro (Tagua, 2012).

La biosíntesis de β -caroteno en *Phycomyces* se lleva a cabo a partir de geranilgeranil pirofosfato (GGPP) a través de siete pasos enzimáticos hasta β -caroteno (ver Introducción general sección 2.4.3.1). En este punto, el β -caroteno es cortado en dos moléculas, C₁₅ y C₂₅, gracias a la oxigenasa de caroteno CarS (Medina et al., 2011). El gen *carS* se induce durante el cruzamiento sexual y se inhibe por luz. Los mutantes *carS* acumulan hasta 50 veces más β -caroteno en oscuridad que el silvestre y hasta 5 veces más en luz que en oscuridad (Tagua, 2012). Se conocen seis alelos para este gen: los alelos *carS179* (estirpe S303) y *carS180* (estirpe S324) introducen un stop prematuro. El alelo *carS43* (estirpe M1) es el que acumula más β -caroteno y reemplaza la serina en posición 433 por una leucina. El alelo *carS42* (estirpe C115) reemplaza la histidina en la posición

80 por una arginina y el alelo *carS153* (estirpe S178) cambia el glutámico en la posición 150 por una lisina. Por último, el alelo *carS98* (estirpe S100) reemplaza la prolina en posición 199 por una serina, siendo el único alelo que permite producir cigosporas en un cruzamiento sexual ya que las estirpes con los demás alelos de *carS* son estériles. Esto es debido a que la proteína originada a partir del alelo *carS98* mantiene una actividad rezumante aunque las cigosporas no consiguen germinar y producir descendencia (Tagua et al., 2012). En los mutantes *carS* no es posible el cruzamiento sexual debido a que no se puede cortar el β -caroteno para dar lugar a los apocarotenoides que son las hormonas sexuales de *Phycomyces*, y por tanto, los mutantes *carS* no son capaces de estimular a la estirpe receptora (Tagua et al., 2012). Posteriormente, la molécula C₂₅ se corta por la oxigenasa AcaA que se activa por la interacción sexual (Medina et al., 2011) produciendo moléculas C₇ y C₁₈. Las moléculas C₁₅, C₇ y C₁₈ forman las familias de apocarotenoides de los monociclofarnesoides, los metilhexanos y los trisporoides, respectivamente (Barrero et al., 2011; Polaino et al., 2010; 2012). Estos apocarotenoides actúan como las feromonas sexuales de los cigomicetos (Polaino et al., 2012). La oxigenasa CarS regula la ruta de biosíntesis de β -caroteno mediante la producción de un apocarotenoide regulador que modifica la actividad de CarA (Tagua et al., 2012).

Los apocarotenoides también incrementan el contenido de carotenos en *Phycomyces* mediante el incremento de la transcripción de los genes *carRA* y *carB* durante el cruzamiento sexual (Almeida & Cerdá-Olmedo, 2008) en una respuesta independiente de la formación de la cigospora (Kuzina & Cerdá-Olmedo, 2006).

En este capítulo investigaremos el papel de WcoB en la fotobiología de *Phycomyces* abordando desde su transcripción hasta las interacciones con proteínas carotenogénicas.

1.2 Resultados

1.2.1 Acumulación de WcoB en *Phycomyces* tras exposiciones a la luz.

En *Phycomyces blakesleeanus* la iluminación del micelio con luz azul incrementa el contenido de ARNm de los genes del tipo *wc*: *wcoA*, *wcoB*, *wctB*, *wctD* (Sanz et al., 2009). Con el fin de conocer la regulación del gen *wcoB* y la proteína codificada por dicho gen se estudió la transcripción del gen *wcoB* y la acumulación de la proteína tras diferentes tiempos de iluminación. Al estudiar la transcripción de *wcoB* en la estirpe silvestre se

confirma que este gen se transcribe tres veces más en luz que en oscuridad y que su transcripción depende del complejo Mad. La mayor acumulación de ARNm de *wcoB* se obtiene tras treinta minutos de iluminación (Figura 1.1).

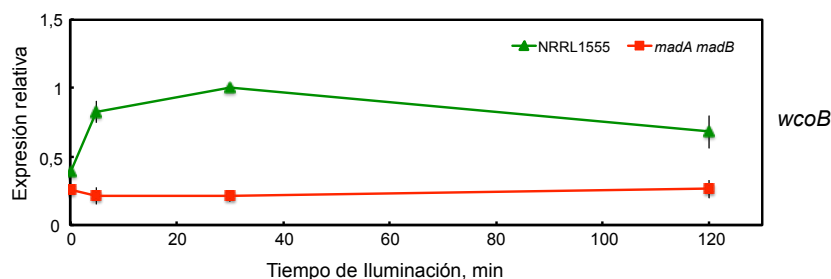


Figura 1.1: Regulación de la transcripción del gen *wcoB* en cultivos iluminados con luz azul en *P. blakesleeanus*. Los micelios crecieron durante 48 horas a 22°C y se iluminaron a distintos tiempos con luz azul o se recogieron en oscuridad. La cantidad de ARNm para cada gen fue ensayada por RT-PCR cuantitativa. Cada señal fluorescente fue primero normalizada a la correspondiente señal obtenida con el gen de la actina (*actA*) para corregir errores de carga y entonces fue normalizado a la señal obtenida a los 30 minutos de iluminación de la estirpe silvestre. En el gráfico se muestran la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

Para ensayar la acumulación de la proteína WcoB se extrajeron las proteínas totales del micelio vegetativo en oscuridad y diferentes tiempos de iluminación. Para ello se utilizaron anticuerpos policlonales contra WcoB producidos a partir de un péptido sintético diseñado a partir la secuencia de dicha proteína. Como se puede observar en la figura 1.2, en la estirpe silvestre la cantidad de WcoB aumenta en luz como sucedía a nivel transcripcional con el gen *wcoB*. Sin embargo, en la estirpe *madA madB* acumulación de WcoB es bastante constante, y no cambia con la iluminación como se espera por la falta de complejo Mad (Figura 1.2).

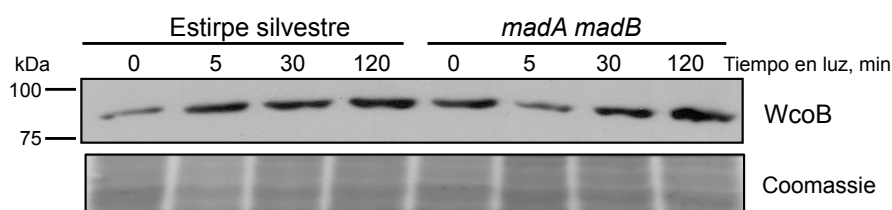


Figura 1.2: Acumulación de WcoB dependiente de la luz azul en la estirpe silvestre y la estirpe *madA madB* de *P. blakesleeanus*. Los micelios crecieron durante 48 horas a 22°C y entonces iluminados a distintos tiempos con luz azul o recogidos en oscuridad. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se hibridaron con el anticuerpo para WcoB. Como control de carga separamos las proteínas mediante SDS-PAGE y posteriormente teñimos el gel con tinción Coomassie.

1.2.2 Localización subcelular de WcoB.

Las proteínas de tipo WC en *Phycomyces* tienen un dominio dedo de zinc que permite la interacción de estas proteínas con el ADN para participar en la regulación de la transcripción de genes fotoinducibles. De las siete proteínas WC presentes en este hongo, WcoB es la única que no tiene el dominio dedo de zinc y por tanto esto sugiere que WcoB se localiza en el citoplasma y que su función no es regular directamente la transcripción. La ubicación subcelular de WcoB se determinó mediante fraccionamiento celular en la estirpe silvestre extrayendo las proteínas de las distintas fracciones (nuclear y citosólica) e hibridándolas con un anticuerpo específico contra WcoB. Como control de purificación de proteínas nucleares se utilizó un anticuerpo contra la histona H2B de *Saccharomyces cerevisiae*. El fraccionamiento se realizó tanto en oscuridad como en cultivos iluminados con el fin de determinar la presencia de la proteína en ambas condiciones o predominantemente en alguna de ellas. WcoB se observó en la fracción citosólica tanto en luz como en oscuridad y, como describimos anteriormente, hay una acumulación mayor en luz que en oscuridad (Figura 1.3).

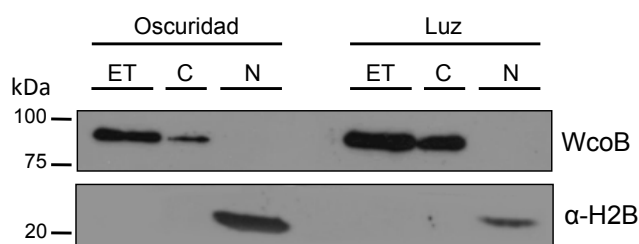


Figura 1.3: Localización subcelular de WcoB. El micelio se cultivó durante 48 horas a 22°C en medio líquido en agitación. Posteriormente los cultivos fueron iluminados 30 minutos o mantenidos en oscuridad. Las proteínas fueron extraídas de las distintas fracciones: proteínas totales (ET), citoplasmáticas (C) y nucleares (N), separadas mediante SDS-PAGE e hibridadas con anticuerpos para WcoB. La misma membrana fue incubada con el anticuerpo para la histona H2B como control de proteínas nucleares.

1.2.3 Inmunoprecipitación de WcoB.

En *Mucor circinelloides* se ha descrito la relación de la proteína MCWC-1b, homóloga a WcoB de *P. blakesleeanus*, con la carotenogénesis mediante la regulación de dicha proteína a través de la ubiquitin ligasa CrgA (Silva et al., 2008). MCWC-1b está implicada en la biosíntesis de carotenos en *Mucor* aunque no está relacionada con la inducción por luz. Se ha demostrado que CrgA interviene en la mono y di- ubiquitilación de MCWC-1b para reprimir la carotenogénesis. Esta acción no está ligada con la degradación de MCWC-1b pero la ubiquilación de esta proteína parece que impide la

transcripción de los genes de la carotenogénesis (Silva et al., 2008). Para investigar si la función de WcoB en *P. blakesleeanus* es similar o no a su homóloga en *Mucor* y para identificar las proteínas que interaccionan con WcoB y que pudieran ayudar a entender su funcionamiento, realizamos experimentos de inmunoprecipitación de proteínas.

Para estos experimentos la estirpe silvestre se cultivó durante 48 horas en medio mínimo líquido y posteriormente se iluminó durante 30 minutos antes de recoger los micelios. Además, mantuvimos micelios en oscuridad durante todo el experimento como control. Durante el experimento de inmunoprecipitación recogimos diferentes muestras: extracto total (INPUT), fracción eluída (FT) y proteínas inmunoprecipitadas (IP). Como control realizamos el mismo experimento pero sin usar el anticuerpo contra WcoB en la etapa de inmunoprecipitación. Posteriormente, las fracciones inmunoprecipitadas se separaron en un gel de acrilamida que se tiñó con sales de plata. Las diferentes bandas obtenidas entre las fracciones inmunoprecipitadas con y sin anti-WcoB fueron identificadas mediante espectrometría de masas (Figura 1.4). Para comprobar el correcto funcionamiento del experimento realizamos experimentos de hibridación de western usando el anticuerpo contra WcoB con los extractos de las diferentes fracciones. Como se observa en la figura 1.4A detectamos la presencia de WcoB en la fracción inmunoprecipitada con WcoB.

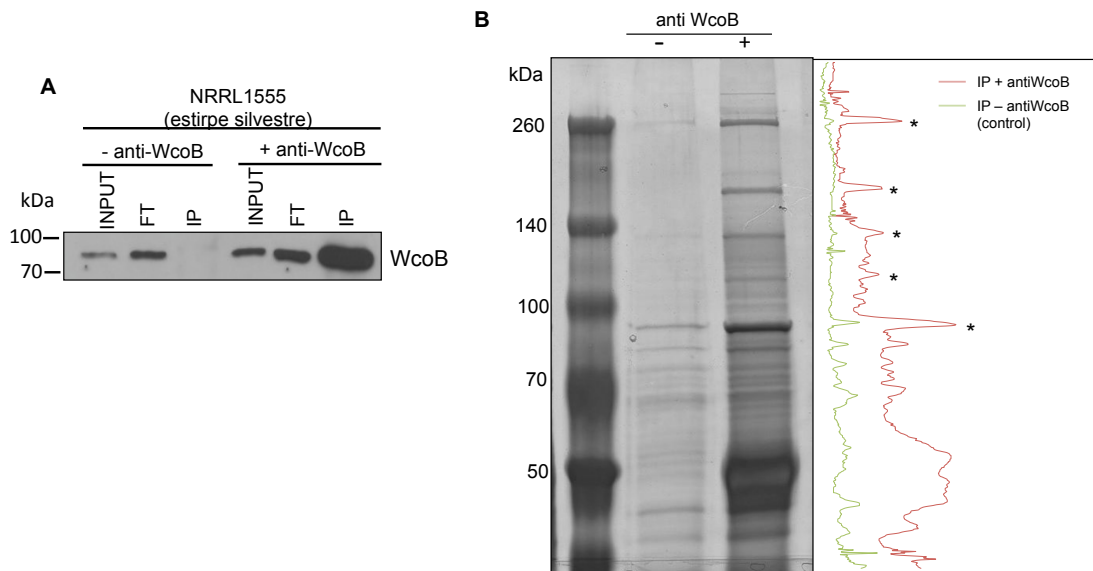


Figura 1.4: Co-Inmunoprecipitación de proteínas usando un anticuerpo contra WcoB. **A)** Hibridación de western para comprobar la inmunoprecipitación (Control). La figura muestra la hibridación de las diferentes fracciones (INPUT, FT e IP) con el anticuerpo contra WcoB. **B)** Tras la inmunoprecipitación las proteínas se separaron mediante una electroforesis SDS-PAGE y se detectaron mediante tinción con sales de plata. El control se llevó a cabo con el mismo extracto de proteínas pero sin añadir el anticuerpo anti-WcoB. La gráfica situada a la derecha del gel de la inmunoprecipitación indica la diferencia de grises entre la IP sin anti-WcoB y con anti-WcoB. En el cromatograma están indicadas con el símbolo * las bandas de proteínas de las que se obtuvieron resultados en la identificación mediante espectrometría de masas.

Este experimento se realizó varias veces con el fin de optimizar la técnica y confirmar las interacciones de las proteínas con WcoB. La primera vez que se realizó la inmunoprecipitación sólo se identificó la proteína CarS, una oxigenasa de caroteno. Al repetir el experimento, el proceso de tinción del gel tras la electroforesis con sales de plata se optimizó identificando nuevas proteínas, además de la proteína CarS. Las proteínas que hemos identificado en los experimentos de inmunoprecipitación que interactúan con WcoB aparecen en la tabla 1.1.

Las primeras inmunoprecipitaciones se realizaron tanto en luz como en oscuridad, pero debido a que este hecho no modificaba el patrón de proteínas inmunoprecipitadas finalmente el resto de experimentos se realizaron con micelios iluminados.

Tabla 1.1: Proteínas inmunoprecipitadas usando el anticuerpo contra WcoB.

Proteína	ID	Descripción	Cobertura (%)	#Péptidos	PM (kDa)	pI
Phybl1.e_gw1.4.1	17470	Quitina sintasa	90,65	12	12,6	9,77
MadB	77137	White Collar-2	73,45	25	40,1	5,81
HSP100	29012	Proteína de choque térmico	72,03	52	100,7	5,68
WcoB	76314	Familia White Collar-1	46,54	41	82,1	6,49
CarRA	180114	Fitoeno sintasa/Licopeno ciclasa	48,34	31	68,6	7,37
CarS	183749	Oxigenasa de caroteno	48,73	28	70,1	6,54
MadA	184132	Familia White Collar-1	35,76	21	73,5	6,07
WcoA	77612	Familia White Collar-1	43,91	29	70,6	6,86
WctC	65293	Familia White Collar-2	44,95	20	42,9	5,21
WctB	179643	Familia White Collar-2	33,42	22	44,9	5,97
HmgS	126185	Hidroximetilglutaril-CoA sintetasa	9,56	5	50,1	6,62

Las proteínas mencionadas en la tabla son las más relevantes para el estudio realizado en este capítulo. #Péptidos: indica los péptidos encontrados de la proteína. PM: indica el peso molecular de la proteína. pI: punto isoeléctrico.

Además de CarS identificamos la interacción entre WcoB y las proteínas CarRA y HmgS (Arrach et al., 2001; Roncero & Cerdá-Olmedo, 1982; Ruiz-Albert et al., 2002; Sanz et al., 2011b). Estas dos proteínas son necesarias para la biosíntesis del β -caroteno lo que sugiere que el fotorreceptor WcoB podría tener un papel regulador sobre la actividad de estas enzimas en la biosíntesis de β -caroteno modulando su actividad por la luz. Además, identificamos interacciones entre WcoB y los componentes del complejo Mad y otras proteínas WC, lo que sugiere que estos fotorreceptores forman un complejo multimérico para regular las respuestas a la luz en *Phycomyces*.

1.2.4 Regulación de la proteína WcoB en mutantes *carS*.

En las diferentes inmunoprecipitaciones de WcoB realizadas en esta tesis siempre hemos detectado la interacción entre WcoB y la oxigenasa de caroteno CarS, además de otras proteínas. Para determinar si la presencia de la proteína CarS mutada afecta a la acumulación de WcoB hicimos experimentos de hibridación de western con proteínas extraídas de dos estirpes con el gen *carS* mutado: la estirpe M1 (alelo *carS43*) que contiene un cambio de serina a leucina en la posición 433 y la estirpe S324 (alelo *carS180*) que contiene un cambio de glutamina por un codón de stop prematuro en la posición 143. En la estirpe S324 la proteína CarS sólo presenta 142 aminoácidos de los 628 aminoácidos que presenta la proteína silvestre, por lo tanto, este mutante puede proporcionar más información sobre cómo se afecta WcoB cuando la mayor parte del dominio oxigenasa de la proteína CarS ha desaparecido (Figura 1.5).

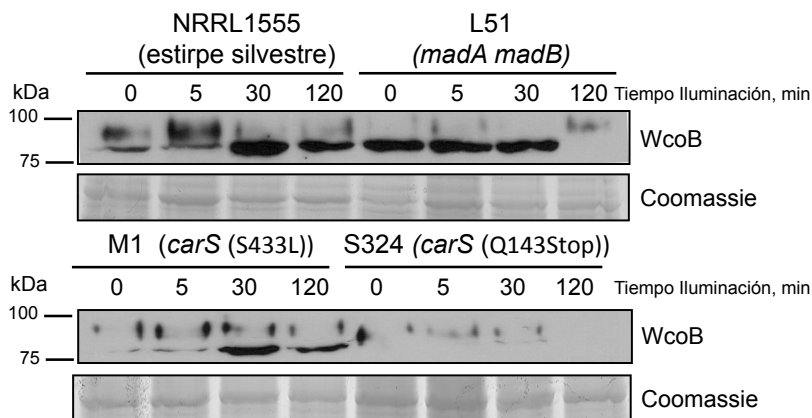


Figura 1.5: Acumulación de WcoB en las estirpe silvestre NRRL1555, L51 (*madA madB*) y mutantes del gen *carS*. Las estirpes fueron cultivadas en medio mínimo durante 48 horas en oscuridad y posteriormente iluminadas a diferentes tiempos con luz azul. Las proteínas fueron extraídas y separadas mediante SDS-PAGE, transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con un anticuerpo específico contra WcoB. Como control de carga se ha utilizado la tinción Coomassie blue.

En la figura 1.5 se observa que la cantidad de WcoB en la estirpe silvestre aumenta en luz con respecto a la oscuridad mientras que en la estirpe *madA madB* la cantidad de WcoB no varía en luz con respecto a oscuridad debido a que está mutado el complejo Mad encargado de regular la transcripción de *wcoB*. La estirpe M1 acumula WcoB como la estirpe silvestre, lo que indica que la mutación presente en este mutante *carS* no afecta a la cantidad de WcoB. Sin embargo, en la estirpe S324 cuya proteína CarS sólo presenta 142 aminoácidos, apenas podemos detectar WcoB a los treinta minutos de iluminación.

Para determinar si la disminución en la cantidad de WcoB en la estirpe mutante S324 se debe a una disminución en la transcripción de *wcoB*, se realizó una RT-PCR

cuantitativa usando los mismos micelios de estos mutantes que usamos para la extracción de proteínas (Figura 1.6).

La figura 1.6 muestra que en los mutantes *carS* se detecta la acumulación del ARNm del gen *wcoB* en luz aunque la acumulación está reducida a la mitad si la comparamos con lo observado en la estirpe silvestre. Los datos de transcripción con los datos de la cantidad de proteínas observada en la figura 6 sugieren que existe una regulación de la interacción de la proteína WcoB y CarS ya que el mutante S324 que carece de la mayor parte de CarS existe transcripción del gen *wcoB* pero no se detecta proteína como ocurre en el caso del otro mutante *carS* (M1). Los resultados sugieren una regulación postraducciona de WcoB mediante la interacción con CarS.

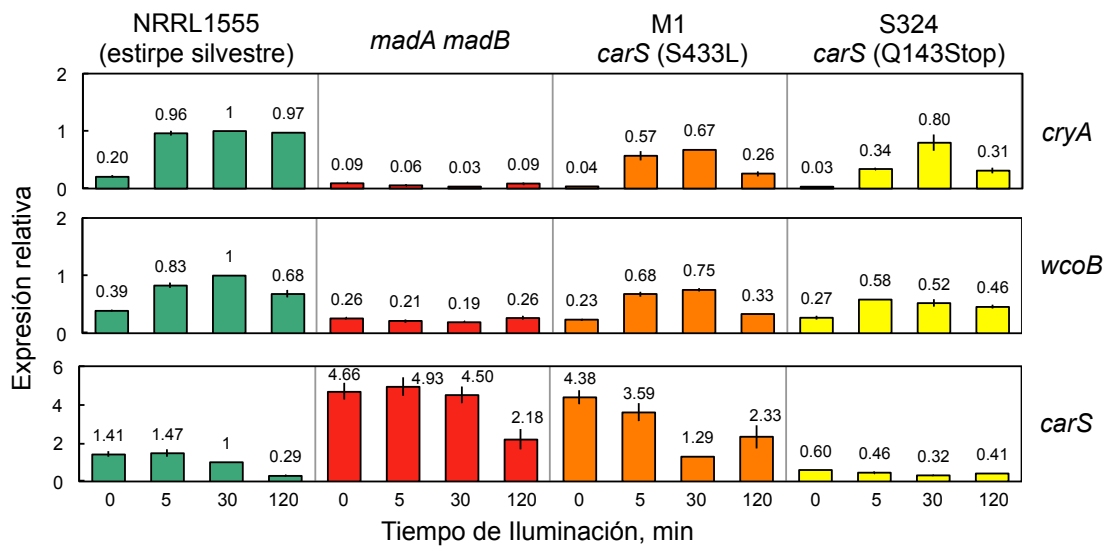


Figura 1.6: Regulación de la transcripción de los genes *wcoB* y *carS* en las estirpes mutantes en el gen *carS* de *P. blakesleeanus*. Los micelios crecieron durante 48 horas a 22°C y entonces fueron iluminados a distintos tiempos con luz azul o recogidos en oscuridad. Las estirpes utilizadas fueron: estirpe silvestre (NRRL1555), L51 (*madA madB*), M1 (alelo *carS43* (S433L)) y S324 (mutante *carS180* (Q143Stop)). La cantidad de ARNm para cada gen fue ensayada mediante RT-PCR cuantitativa. Cada señal fluorescente fue primero normalizada a la correspondiente señal de actina (*actA*) para corregir errores de carga y entonces fue normalizado a la señal obtenida a los 30 minutos de iluminación de la estirpe silvestre. En el gráfico se muestran la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

La expresión del gen *carS* se reprime en luz en la estirpe silvestre al igual que en el mutante *madA madB* y los mutantes *carS*. En el doble mutante *madA madB* la transcripción del gen *carS* es mayor al compararla con la del mismo gen en la estirpe silvestre. Sin embargo, la expresión de *carS* en los mutantes de dicho gen varía entre ellos. El mutante M1 tiene una cinética de expresión como la estirpe silvestre pero con mayores niveles de transcripción del gen *carS* mientras que la estirpe S324 la transcripción de *carS* es muy baja y no sigue la cinética observada para este gen en la estirpe silvestre. Estos

datos sugieren una retroalimentación en la regulación de la transcripción por la luz por el propio gen *carS*, ya que cuando la proteína CarS carece prácticamente del dominio oxigenasa los niveles de transcripción del gen *carS* disminuyen casi a cero, y cuando la proteína CarS tiene una mutación puntual los niveles de transcripción de dicho gen aumentan.

1.2.5 Localización de la proteína WcoB-GFP en *Aspergillus nidulans*.

Para investigar la localización de WcoB *in vivo* y demostrar *in vivo* las interacciones entre WcoB y otras proteínas, realizamos experimentos de expresión heteróloga usando *Aspergillus nidulans* como modelo ya que *Phycomyces blakesleeanus* no se ha conseguido transformar con ADN exógeno de manera estable (Obraztsova et al., 2004). Para estos experimentos hemos transformado *Aspergillus nidulans* con el gen *wcoB* de *Phycomyces blakesleeanus* fusionado a la proteína fluorescente GFP para su detección *in vivo*. Para ello, se clonó el ADNc de *wcoB* en el plásmido pSR46 bajo el control del promotor del gen para la histona *H2B*. Además, clonamos también los ADNc de los genes *madA* y *madB* de *P. blakesleeanus*, homólogos a *wc-1* y *wc-2* de *Neurospora*, cuya localización se espera que sea nuclear, ya que tienen dominios dedo de zinc para interaccionar con el ADN (Sanz et al., 2009). Además estas proteínas forman el complejo Mad encargado de la transcripción de un gran número de genes fotoinducibles (Sanz et al., 2009). Por el contrario esperamos que WcoB se acumule en el citoplasma por la falta de dominio de interacción con el ADN y los resultados obtenidos en los experimentos de fraccionamiento subcelular. También transformamos *A. nidulans* con una fusión del gen *carS* al gen que codifica para la GFP para comprobar si se localiza también en el citosol como WcoB para dar lugar a la interacción. Realizamos experimentos de microscopía de fluorescencia utilizando las instalaciones del laboratorio del Prof. Fischer (KIT, Karlsruhe, Alemania) (Figura 1.7).

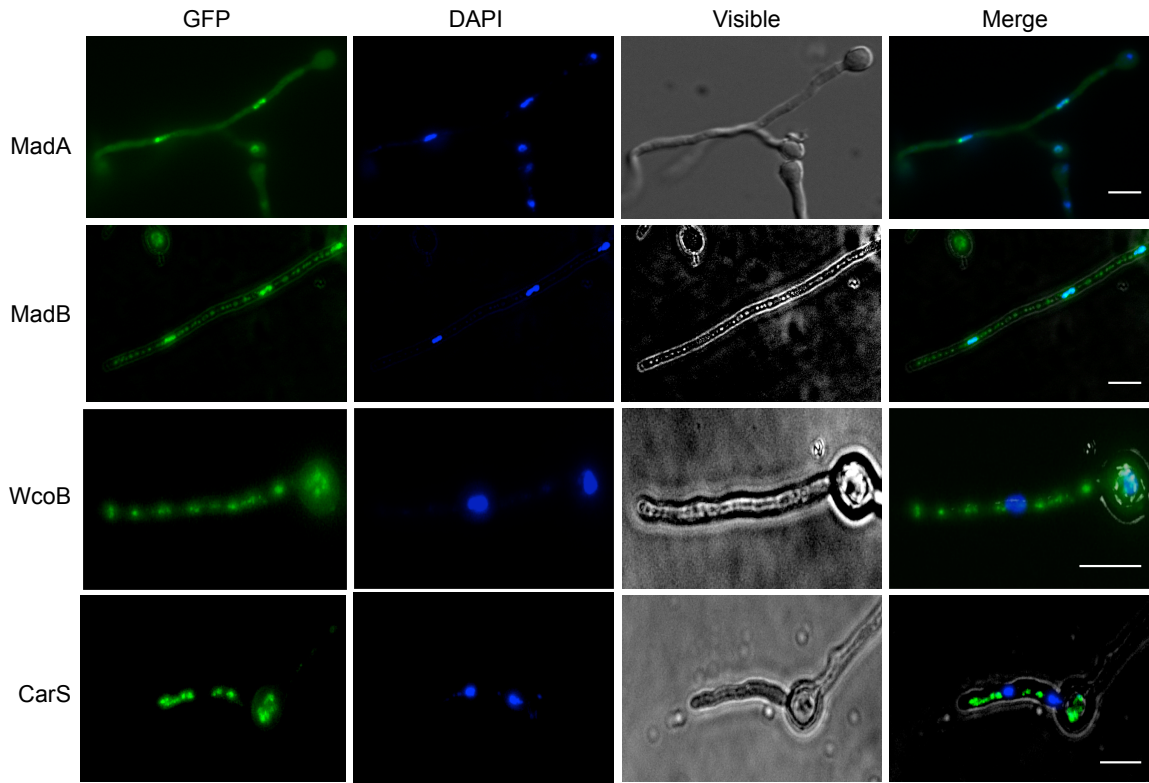


Figura 1.7: Localización de las proteínas MadA, MadB, WcoB y CarS de *P. blakesleeanus* etiquetadas con GFP en *A. nidulans*. Las proteínas MadA y MadB se utilizaron como control ya que su localización se presuponía nuclear. MadA y MadB se localizan en el núcleo mientras que WcoB y CarS se localizan en el citoplasma. Para localizar los núcleos se utilizó DAPI (azul). La línea blanca representa 10 μm .

En los experimentos de microscopía observamos que MadA y MadB se localizan en el núcleo ya que actúan como factores de transcripción (Sanz et al., 2009). La localización de WcoB y CarS ocurre en el citoplasma del hongo. Este resultado era esperado porque previamente demostramos que WcoB se localiza en el citoplasma en *Phycomyces* (Figura 1.3). Estos resultados también muestran que las señales que permiten la localización nuclear o citoplásmica están conservadas entre *Aspergillus* y *Phycomyces*.

1.2.6 Interacción entre WcoB y CarS de *Phycomyces* mediante BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) en *Aspergillus nidulans*.

Para confirmar la interacción entre WcoB y CarS de *P. blakesleeanus* investigamos si se observa esta interacción *in vivo* en *Aspergillus* mediante BiFC, una técnica para corroborar interacciones proteicas. Esta técnica se basa en la asociación de fragmentos de proteínas fluorescentes fusionados a proteínas cuya interacción se quiere comprobar. De esta manera si se quiere comprobar la interacción de una proteína A con otra B, se fusiona la proteína A a la fracción N-YFP de la proteína fluorescente YFP y la proteína B a la

fracción C-YFP. Si las proteínas A y B interactúan, provocarán la proximidad de los fragmentos N-YFP y C-YFP reconstituyendo la estructura de la proteína YFP y por consiguiente fluorescencia (Figura 1.8). Esta técnica permite la detección de interacciones débiles o transitorias ya que la señal fluorescente generada es estable (Kerppola, 2006a; 2006b; Marani et al., 2002).

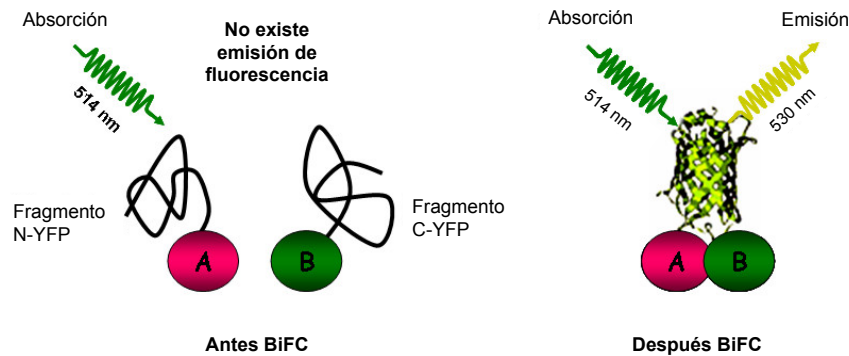


Figura 1.8: Esquema del funcionamiento de la técnica BiFC. El esquema representa el principio en el que se basa el ensayo BiFC, utilizando el fluoróforo YFP dividido. Las proteínas A y B se fusionan a los fragmentos N- y C-terminales de YFP, respectivamente. En ausencia de una interacción entre A y B, las mitades de fluoróforo son no funcionales. Tras la interacción entre A y B, se reconstituye un fluoróforo funcional que exhibe emisión de fluorescencia tras la excitación con una longitud de onda apropiada. Modificado de (Bhat et al., 2006).

Se clonó el ADNc del gen *wcoB* en un plásmido con la fracción N-YFP y el ADNc del gen *carS* se clonó en el plásmido con la fracción C-YFP. Si estas proteínas interactúan *in vivo*, las dos fracciones de proteína YFP interactuarán y emitirán fluorescencia. Este experimento servirá para confirmar que la interacción que se ha observado en extractos de proteínas mediante inmunoprecipitación de proteínas también se observa *in vivo*, al igual que se conocerá la ubicación de esta interacción y el grado de estabilidad de la interacción en *Aspergillus nidulans* (Figura 1.9).

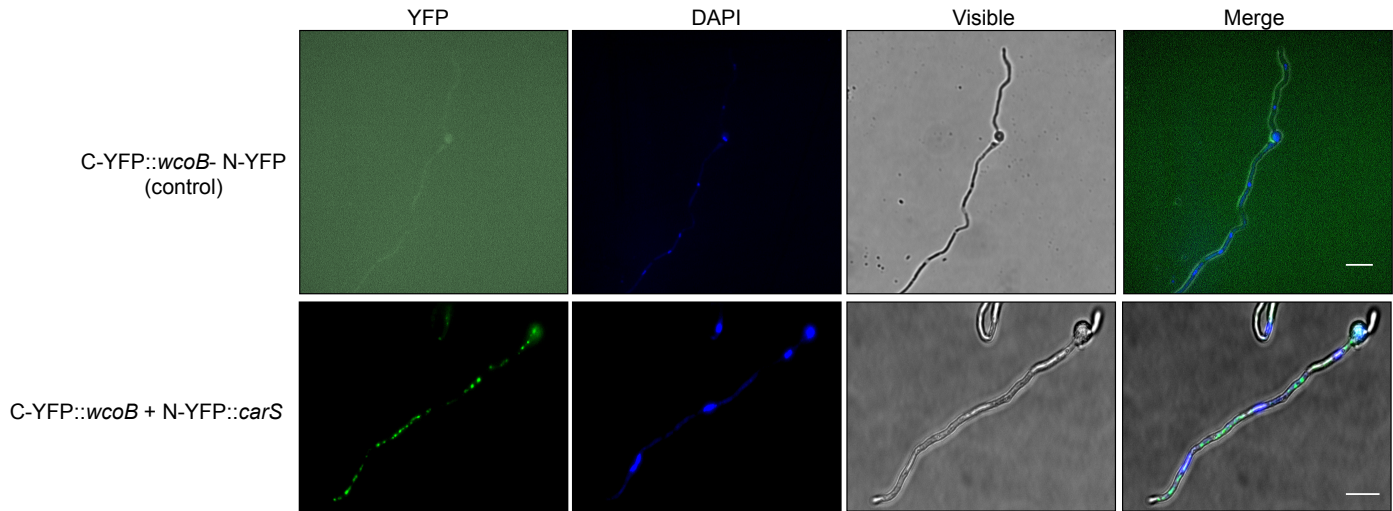


Figura 1.9: WcoB y CarS de *P. blakesleeanus* interaccionan en *A. nidulans* utilizando la técnica BiFC. C-YFP::*wcoB* interacciona con N-YFP::*carS* y dicha interacción provoca la emisión de fluorescencia (YFP). Para localizar los núcleos se usó DAPI (azul). Como control se usó el plásmido con la fracción C-terminal de la YFP y otro plásmido con la fracción N-YFP sin genes. La línea blanca representa 10 μ m.

En la figura 1.9 se puede observar que WcoB interacciona con CarS y que su localización es citoplasmática. Como control del experimento se transformó la estirpe SVK103 (*veA*⁺, *pyroA4*, *pyrG89*) de *Aspergillus* con el plásmido con la fracción C-YFP clonado contiguo al ADNc del gen *wcoB* y otro plásmido que tiene la fracción N-YFP sin ningún gen clonado. De esta forma al no interaccionar WcoB con nada, no se emitirá fluorescencia ya que no se formará la proteína YFP silvestre (Figura 1.9).

1.2.7 Ubiquitinación de WcoB en *P. blakesleeanus*.

En *M. circinelloides* la proteína MCWC-1b se ubiquitina por la proteína CrgA de manera independiente de su degradación en el proteasoma 26S (Silva et al., 2008). Para comprobar si WcoB de *P. blakesleeanus* está regulada de la misma manera que su homólogo en *Mucor*, hicimos experimentos de inmunoprecipitación de proteínas y detección con anticuerpos contra la ubiquitina (Figura 1.10).

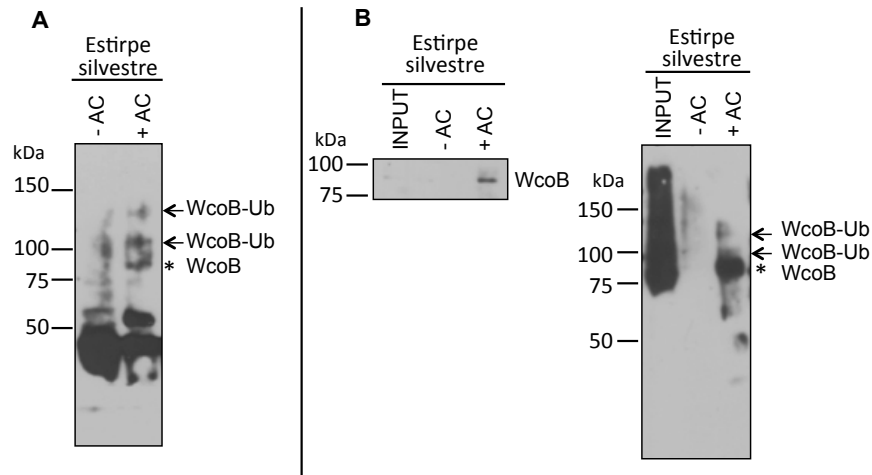


Figura 1.10: Ubiquitinación de WcoB. Alicuotas de proteínas de micelio cultivado durante 48 horas en medio líquido en oscuridad, y transcurrido este tiempo se iluminó durante 30 minutos. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a membrana de nitrocelulosa. Posteriormente se realizó la inmunoprecipitación usando un anticuerpo específico contra WcoB (+AC). Como control se realizó también la inmunoprecipitación sin anticuerpo contra WcoB (-AC). La membrana fue hibridada contra un anticuerpo contra la Ubiquitina y también contra WcoB (control). En algunos casos también se cargó en el gel el INPUT (extracto total de proteínas). El * indica el tamaño predico para WcoB, mientras que las flechas indica WcoB ubiquitinada. A) Primera prueba usando el anticuerpo contra Ubiquitina. B) Segundo experimento usando nuevas inmunoprecipitaciones hibridando la membrana con anti-Ubiquitina. En esta ocasión se muestra el control contra anti-WcoB.

Los resultados de este experimento permiten observar que WcoB está ubiquitinada, ya que como aparece en la figura 1.10 se observa una proteína ubiquitinada con el tamaño predicho para WcoB (82,2 kDa) y dos bandas de WcoB ubiquitinada, una por debajo de 100 kDa y otra por encima de 100 kDa. Este hecho nos hace sospechar que WcoB puede estar regulada como MCWC-1b en *Mucor* (Silva et al., 2008).

1.3 Discusión.

La activación por luz de los genes *wcoA*, *wcoB*, *wctB* y *wctD* de *Phycomyces* sugiere que estos productos génicos pueden ser necesarios después de una exposición a la luz, o para responder a diferentes intensidades de luz (Sanz et al., 2009). La transcripción de estos genes depende del complejo Mad ya que en el doble mutante *madA madB* la transcripción de estos genes es prácticamente nula (Sanz et al., 2009). Estudios previos del gen *wcoB* han confirmado que son necesarias intensidades altas de luz (1 J/m²) para el inicio de su transcripción (Sanz et al., 2009).

Nuestros resultados han permitido confirmar que el gen *wcoB* se transcribe levemente más en luz que en oscuridad y que este incremento coincide con la acumulación de la proteína en las mismas condiciones. Este sutil incremento en la cantidad de WcoB puede deberse a que este fotorreceptor sólo esté optimizado para altas

intensidades de luz siendo suficiente poco incremento en la transcripción tanto de ARNm como de proteína para cubrir las necesidades del hongo. Además, el fotorreceptor WcoB puede estar ayudando al complejo Mad para activar genes cuando *Phycomyces* está sometido a diferentes intensidades lumínicas (Sanz et al., 2009).

WcoB es la única proteína de tipo WC de *Phycomyces* que carece de un dominio dedo de zinc para interaccionar con el ADN (Sanz et al., 2009). Esto nos hace especular con la idea de que WcoB ejerza su función fuera del núcleo. Esta hipótesis fue confirmada con nuestros experimentos de localización subcelular donde demostramos que esta proteína se encuentra fuera del núcleo. Los experimentos de localización *in vivo* en *Aspergillus* han confirmado su localización citoplásmica también en este hongo. Todo indica que WcoB no actúa como factor de transcripción y que debe estar regulando algún proceso biológico dependiente de la luz en el citoplasma.

Para descubrir qué papel ejerce WcoB en *Phycomyces* se hicieron experimentos de inmunoprecipitación de proteínas. Con estos experimentos confirmamos la interacción de WcoB con proteínas de la ruta de biosíntesis de β -caroteno como CarS, CarRA, o CarB, y con proteínas de tipo WC como MadA, MadB o WcoA entre otras. Este resultado sugiere que WcoB podría controlar la biosíntesis del β -caroteno regulando las proteínas que participan en esta ruta. Además, la interacción de WcoB con proteínas de tipo WC no debe extrañar ya que esta proteína presenta dos dominios PAS y un dominio LOV. La interacción entre las proteínas WC de *Phycomyces* se ha comprobado previamente a través de ensayos de doble híbrido en levaduras pero sólo se ha observado en el caso de la interacción de MadA con MadB (Sanz et al., 2009). Esto hecho puede ser debido a que las interacciones entre las proteínas WC podrían estar mediadas por otras proteínas u otras condiciones lumínicas diferentes a de las de dicho ensayo.

Las interacciones entre proteínas WC, incluyendo a WcoB, sugieren la formación de varios tipos de complejos fotorreceptores en *Phycomyces*. No sabemos si estos complejos se forman en el núcleo o en el citoplasma ya que las inmunoprecipitaciones se realizaron con extracto totales de proteínas. La localización citoplásmica de WcoB sugiere que las interacciones que hemos detectado ocurren en el citoplasma y es posible que se formen complejos entre WcoB y otras proteínas WC en el citoplasma para la regulación por la luz de procesos biológicos citoplásmicos. También es posible que exista una pequeña cantidad de WcoB en el núcleo que no detectamos y que interaccione con MadB u otras proteínas

WC-2 para regular la transcripción usando su dominio dedo de zinc. En hongos basidiomicetos la proteína WC-1 no tiene dominio dedo de zinc y utiliza el que tiene WC-2 para regular la transcripción (Idnurm & Heitman, 2005). En cualquier caso, averiguar el papel biológico de estos complejos y su función permitirá entender mejor los mecanismos moleculares que participan en la fotobiología de *Phycomyces*.

En *Mucor circinelloides* se confirmó la relación de la proteína MCWC-1b, homóloga a WcoB de *Phycomyces*, con la carotenogénesis mediante su regulación a través de la ligasa de ubiquitina CrgA (Silva et al., 2008). MCWC-1b actúa como activador de la carotenogénesis y su inactivación está mediada por la mono- y diubiquitinación a través de CrgA. En *Phycomyces* hemos observado también la ubiquitinación de WcoB, hemos encontrado diferentes bandas correspondientes a WcoB ubiquitinada lo que sugiere la mono- o diubiquitinación de la proteína. Este resultado y el hecho de que hayamos detectado la ubiquitinación de WcoB con proteínas carotenogénicas nos sugiere que WcoB regula de alguna manera aún desconocida la carotenogénesis en *Phycomyces*. Además, el encontrar a WcoB ubiquitinada apoya la idea de que esta proteína puede estar regulada igual que su homóloga en *Mucor*. Hemos observado que la versión truncada de CarS en el alelo *carS180* da lugar a la reducción en la acumulación de WcoB (Figura 5). Es posible que la falta de la proteína CarS completa promueva la degradación de WcoB, quizás a través de la ubiquitinación que hemos detectado.

En conclusión, nuestros resultados indican que WcoB es una proteína que se localiza en el citoplasma e interacciona con otras proteínas del tipo WC y enzimas de la biosíntesis del β -caroteno seguramente para regular su actividad por la luz.

Capítulo 2

El gen *madC* de *Phycomyces* y su homólogo en
Neurospora

2.1 Introducción

La luz regula el desarrollo y comportamiento de los hongos. El desarrollo de un hongo ocurre en varias etapas: germinación de las esporas, crecimiento y ramificación de las hifas, y la formación de las estructuras reproductoras para el desarrollo y dispersión de las esporas. Estos procesos están regulados por muchos factores ambientales, incluyendo la presencia o ausencia de luz (Corrochano, 2007; Idnurm et al., 2010). La mayoría de respuestas a la luz en hongos se deben a la luz azul que actúa como señal ambiental activando rutas metabólicas como la síntesis de carotenos, regulando el desarrollo o dirigiendo el crecimiento de estructuras reproductoras. La activación por la luz azul de la biosíntesis de carotenos en *Phycomyces blakesleeanus* y *Neurospora crassa* y el fototropismo de los cuerpos fructíferos de *Phycomyces* han servido como modelos de respuestas a la luz azul en hongos (Cerdá-Olmedo, 2001; Corrochano & Garre, 2010; Olmedo et al., 2013).

La búsqueda de mutantes de *Phycomyces* alterados en el fototropismo permitió el aislamiento y la caracterización de los mutantes *mad*. Se han identificado diez genes *mad* que han sido nombrados desde *madA* a *madJ* (Bergman et al., 1973; Campuzano et al., 1995; Eslava et al., 1976; Orejas et al., 1987). Los genes *madA* y *madB* codifican para las proteínas que forman el complejo fotorreceptor principal de *Phycomyces*, el Complejo Mad, que actúa como factor de transcripción para los genes fotoinducibles de *Phycomyces* (Idnurm et al., 2006; Sanz et al., 2009).

Phycomyces no se ha podido transformar de manera estable con ADN exógeno (Obraztsova et al., 2004). Este hecho dificulta los estudios sobre la función de los genes en este hongo. Sin embargo, una ventaja a la hora de investigar el papel de ciertos genes en *Phycomyces* es la disponibilidad de la secuenciación y anotación del genoma de dicho hongo (Corrochano et al., 2016). La base de datos del genoma ofrece herramientas útiles para la localización de los genes como por ejemplo los SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) entre las estirpes silvestres UBC21 (sexo +) y NRRL1555 (sexo -). En algunos casos, estos SNPs son dianas de restricción para ciertas enzimas que cortan el ADN en una de las estirpes silvestres y no en otra. Este hecho es la base de la técnica RFLP-PCR que junto con el fenotipo observado del gen permite su localización en el genoma mediante un análisis genético que permita estimar las frecuencias de recombinación entre cada RFLP y la mutación que deseamos localizar (Chaudhary et al., 2013).

Los mutantes del gen *madC* fueron encontrados tras una mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-Nitrosoguanidina (NTG) o con el mutágeno ICR-170 (Eslava et al., 1976). Estos mutantes sólo están afectados en el fototropismo del esporangióforo mientras que las respuestas miceliares a la luz (carotenogénesis y morfogénesis) no se ven afectadas (Bergman et al., 1973; Corrochano & Cerdá-Olmedo, 1992). Por ello, se pensó que el gen *madC* era responsable de un fotorreceptor que interviene en el fototropismo del esporangióforo para la recepción de la luz junto con el complejo Mad en *P. blakesleeana* (Galland & Lipson, 1985a).

Los resultados de este capítulo son parte de una colaboración internacional que ha permitido identificar el gen *madC* mediante clonación posicional como un gen que codifica para una proteína que activa la función GTPasa de Ras (Polaino et al., 2017). Las proteínas Ras (*Rat Sarcoma*) tienen la capacidad de servir como “interruptores moleculares” mediante el intercambio entre las conformaciones RasGDP (inactivo) o RasGTP (activo) que presentan dos propiedades principales compartidas por todas las GTPasas: en primer lugar la capacidad de unirse a nucleótidos de guanina con alta afinidad (Lenzen et al., 1998), y en segundo lugar su capacidad para hidrolizar GTP a GDP y fosfato inorgánico (Pi) (Hennig et al., 2015). El paso de la proteína RasGDP a RasGTP se lleva a cabo por la familia de proteínas llamadas GEFs (Factor intercambiador de nucleótido de guanina) mientras que la transición de RasGTP a RasGDP se debe a la actividad de proteínas RasGAPs (Proteínas Activadoras de la función GTPasa para Ras). La tasa de hidrólisis de GTP determina el tiempo de vida del estado activado (Hennig et al., 2015).

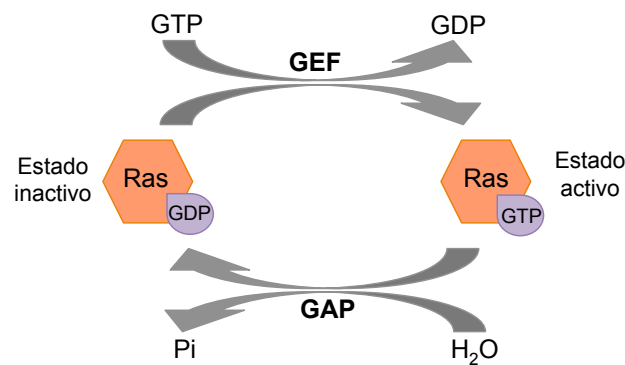


Figura 2.1: Modelo de activación de las proteínas Ras. La transición de RasGDP a RasGTP se lleva a cabo por las proteínas GEF mientras que la transición de RasGTP a RasGDP se lleva a cabo por las GAP.

Las proteínas Ras de hongos juegan un papel importante en el crecimiento celular y la morfogénesis. En *S. cerevisiae*, se ha descrito que la proteína Ira1, una RasGAP, regula negativamente los niveles de AMP_c en condiciones de falta de nutrientes a través de la proteína Ras2 (Tanaka et al., 1989). *S. pombe* presenta otra proteína RasGAP, llamada Sar1, capaz de complementar la función de IRA1 en *S. cerevisiae* (Wang et al., 1991). Otra proteína RasGAP llamada LRG1 encontrada en el hongo *N. crassa*, es esencial para la extensión de la hifa y también para restringir la formación excesiva de ramificaciones en las regiones subapicales de ésta (Vogt & Seiler, 2008).

En *Aspegillus nidulans*, la proteína GapA juega un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad, y es necesaria para el desarrollo normal de los conidióforos. La ausencia de GapA resulta en una desorganización del citoesqueleto de actina y defectos en la polarización. GapA juega un papel fisiológico mediante la regulación de RasA estimulando la actividad GTPasa de Ras. La proteína GapA, al igual que la proteína MadC de *P. blakesleeanus*, presenta dos dominios principales: RasGAP, que incluye desde el aminoácido 177 al 484; y un dominio llamado RasGAP-C, que incluye desde el aminoácido 583 al 702 de la proteína. Mutantes en la proteína GapA que carecen del dominio RasGAP-C sugieren que este dominio juega un importante papel en la funcionalidad de la GapA ya que al faltar este dominio la proteína se vuelve inestable (Harispe et al., 2008).

En ensayos de doble híbrido se comprobó que la proteína MadC interacciona físicamente con dos proteínas Ras, RasA y RasB, corroborando su función como proteína RasGAP. *S. cerevisiae* contiene en su genoma dos genes RasGAP, llamados *IRA1* e *IRA2*, homólogos al gen *madC* de *P. blakesleeanus* y al gen *nf1* de *H. sapiens* (Xu et al., 1990). Los mutantes de *S. cerevisiae* con el gen *IRA1* delecionado son sensibles al choque térmico (Tanaka et al., 1989; Wang et al., 1991). Al expresar el ADNc del gen *madC* de *P. blakesleeanus* en la estirpe *Δira1* de *S. cerevisiae* se restaura la resistencia al choque térmico a niveles de la estirpe silvestre sugiriendo que MadC conserva su función en la regulación de Ras. En *N. crassa* fue identificado el mutante *band* (*bd*) que proporciona un patrón de bandas de conidios asexuales aproximadamente cada 22 horas como parte de la salida del ritmo circadiano, mientras que la estirpe silvestre tiene un patrón difuso de conidiación. El mutante *band* tiene un alelo dominante del gen que codifica para una Ras llamada RAS-1 cuyo alelo se conoce como *ras-1^{bd}* que provoca un incremento en la expresión del

principal regulador de la conidiación, el gen *fluffy* (*fl*) además de *con-6* y *con-10* (Belden et al., 2007b). La mutación que presenta la estirpe *ras-1^{bd}* consiste en un cambio de citosina por timina que conlleva un cambio de la treonina 79 a isoleucina (Belden et al., 2007b). Esta mutación ocurre en una región altamente conservada (switch II) vital para la interacción con las proteínas GEFs (Milburn et al., 1990). En el mutante *ras-1^{bd}* se eleva la tasa de intercambio entre Ras-GDP y Ras-GTP comparada con la estirpe silvestre. Además, la transcripción de los genes implicados en la conidiación está incrementada en el mutante *ras-1^{bd}* al igual que la expresión del gen *wc-1*. También se ha observado que en el mutante *ras-1^{bd}* hay menos cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) pero el efecto en la estirpe *ras-1^{bd}* es mayor que en la estirpe silvestre ya que RAS-1^{bd} es más sensible a estos compuestos que la proteína silvestre. Estos resultados relacionan las proteínas Ras con las ROS amplificando la señal endógena y desencadenando el desarrollo de los conidios siguiendo un ritmo circadiano (Belden et al., 2007b). Adicionalmente, *ras1^{bd}* tiene un incremento en la transcripción de *wc-1* aunque la cantidad de proteína sea menor que en la estirpe silvestre (Belden et al., 2007b; Loros et al., 2007). Se propuso entonces que las ROS tienen un efecto directo en WC-1, por lo que el dominio LOV es oxidado directamente por el superóxido incrementando su actividad y hace que WC-1 sea más activo (Belden et al., 2007b; Yoshida & Hasunuma, 2004). Estos datos sugieren que RAS y ROS contribuyen positivamente a la activación de WC-1 y que múltiples vías intervienen en el reloj biológico y afectan a la amplitud de la expresión regulada por el ritmo circadiano (Belden et al., 2007b).

En este capítulo estudiaremos la localización del gen *madC* en el genoma de *P. blakesleeanus* y su implicación en la fotobiología de dicho hongo. Además investigaremos algunas características del gen *ira-1* (NCU06122) de *N. crassa*, homólogo a *madC*, por su posible papel en la fotobiología de *N. crassa*.

2.2 Resultados

2.2.1 Ligamiento entre la mutación *madC* y marcadores moleculares en el genoma de *Phycomyces*.

Los mutantes *madC* de *Phycomyces blakesleeanus* sólo están afectados en el fototropismo del esporangióforo ya que las respuestas del micelio no se ven afectadas (Bergman et al., 1973). Estos mutantes son 10⁶ veces menos sensibles a la luz azul que la estirpe silvestre NRRL1555. La secuenciación del genoma de *Phycomyces blakesleeanus*

ha permitido disponer de un mapa de polimorfismos (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) entre las estirpes silvestres UBC21 y NRRL1555 (Chaudhary et al., 2013).

La secuenciación del genoma de las estirpes UBC21 (sexo +) y NRRL1555 (sexo -) ha permitido utilizar como herramienta para la identificación del gen *madC* mediante análisis genético la técnica denominada RFLP (Restriction Fragment Length polymorphism)-PCR. Esta técnica consiste en la amplificación por PCR de un fragmento del genoma de diferentes estirpes con un SNP que da lugar a un cambio del sitio de reconocimiento de una enzima de restricción. De esta manera se generan distintos patrones de fragmentos en el gel de electroforesis (figura 2.2) tras la digestión enzimática de los fragmentos amplificados. La frecuencia de recombinación entre cada SNP y la mutación objeto de estudio permitirá averiguar la distancia genética entre los diferentes marcadores moleculares y el gen *madC*.

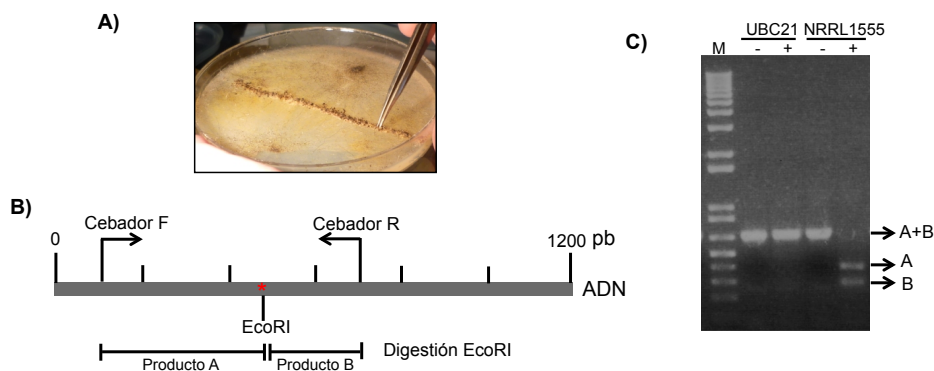


Figura 2.2: Procedimiento seguido para la localización del gen *madC*. **A)** Fotografía de la recolección de cigosporas procedentes de los cruces de UBC21 (+) con las estirpes mutantes *madC* (-) (fondo genético NRRL1555). Los esporangioforos de ambas estirpes fueron eliminados de la placa para una mejor recolección de cigosporas. **B)** Proceso seguido para el diseño de cebadores que flanquean un marcador (*) (PCR-RFLP) que es diana de restricción para un fondo genético (NRRL1555) y no para el otro (UBC21). **C)** En este ejemplo, la enzima EcoRI cortará el fragmento de PCR originado por los cebadores F y R de 700 pb (A+B) en dos fragmentos, uno de 400 pb (producto A) y otro de 300 pb (producto B) en la estirpe con fondo genético NRRL1555 y no en la estirpe con fondo genético UBC21. M: marcador; signo -: el fragmento de ADN no ha sido digerido (PCR); signo +: el fragmento de ADN fue digerido con la enzima EcoRI. Este procedimiento se llevará a cabo con todos los descendientes obtenidos en los cruzamientos.

Para examinar la frecuencia de recombinación entre los distintos SNPs y el gen *madC* se cruzó la estirpe UBC21 con las estirpes B2 y A905 (mutantes *madC*). Como los parentales B2 y A905 tienen el mismo fondo genético que la estirpe NRRL1555, se puede comparar la frecuencia de recombinación entre los distintos SNPs asociados a cada contig y la mutación *madC*.

Se realizaron dos cruces entre UBC21 y B2 de los que se aislaron 61 descendientes procedentes de 61 cigosporas. Las germosporas de cada cigospora se inocularon en medio mínimo ácido para seleccionar una colonia al azar de cada cigospora. Se realizaron dos cruces entre UBC21 y A905, de los cuales se aislaron 36 descendientes procedentes de 36 cigosporas.

2.2.2 Caracterización del fototropismo de los descendientes de cada cruzamiento.

Para realizar los análisis de recombinación entre el gen *madC* y los SNPs seleccionados se comprobó el fototropismo del esporangióforo de los 97 descendientes obtenidos (Figura 2.3).



Figura 2.3: Fototropismo en *Phycomyces*. Los esporangióforos de la estirpe silvestre crecen hacia la fuente de luz (fototropismo positivo), mientras que la estirpe mutante *madC* no (fototropismo negativo).

El número de descendientes con fototropismo positivo o negativo de cada cruce está indicado en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Fototropismo de los descendientes obtenidos en los cruzamientos entre UBC21 y los mutantes *madC* (B2 y A905).

		Fototropismo	
		silvestre	<i>madC</i>
UBC21 x B2	1 ^{er} cruce	18 (37,5%)	30 (62,5%)
	2 ^o cruce	1 (7,7%)	12 (92,3%)
UBC21 x A905	1 ^{er} cruce	14 (63,64%)	8 (36,36%)
	2 ^o cruce	7 (50%)	7 (50%)
Total		40 (41,2%)	57 (58,8%)

Los resultados muestran que el fenotipo *madC* se reparte de manera más o menos equivalente entre toda de la descendencia (58,8%).

2.2.3 Comprobación del sexo de los descendientes de cada cruzamiento.

P. blakesleanus es heterotálico y por tanto presenta estirpes que tienen el gen *sexP* (sexo +) o estirpes con el gen *sexM* (sexo -). Para comprobar cómo segrega el locus del sexo en los cruzamientos que realizamos, se comprobó el sexo de todos los descendientes mediante amplificación por PCR utilizando cebadores específicos (Tabla 2.2). Los resultados muestran un incremento en los descendientes de sexo - entre todos los descendientes analizados (Figura 2.4).

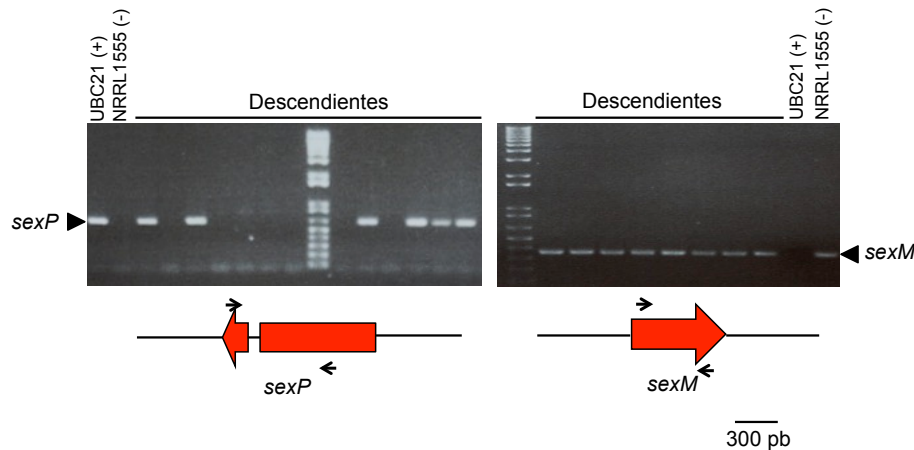


Figura 2.4: Comprobación del sexo de los descendientes de los cruzamientos entre UBC21 y los mutantes *madC*. El sexo de cada estirpe se comprobó mediante PCR usando cebadores específicos para cada gen, *sexP* y *sexM*.

Tabla 2.2: Porcentaje de descendientes con sexo + o sexo - obtenidos en los cruzamientos entre la estirpe silvestre (UBC21) y los distintos mutantes *madC* (B2 y A905).

Sexo			
		+	-
UBC21 x B2	1 ^{er} cruce	22 (45,83%)	26 (54,16%)
	2 ^o cruce	1 (7,7%)	12 (92,3%)
UBC21 x A905	1 ^{er} cruce	10 (45,45 %)	12 (54,54%)
	2 ^o cruce	3 (21,43%)	11 (78,57%)
Total	97	36 (37,11%)	61 (62,89%)

En teoría, esperábamos obtener un 50% de descendientes de cada sexo, y un 50% de descendientes con fenotipo *madC*. Creemos que las diferencias entre los resultados esperados y obtenidos se deben a las variaciones que se suelen observar con los cruzamientos entre estas dos estirpes silvestres (Alvarez & Eslava, 1983a) y a las diferencias entre sus respectivos fondos genéticos. Los cruzamientos utilizando la estirpe

A56 que es isogénica con NRRL1555 (Alvarez & Eslava, 1983a) suelen dar lugar a descendencias con un reparto del genoma más regular pero la isogenicidad elimina la gran mayoría de SNPs que son necesarios para la realización de este proyecto.

Las diferencias en el reparto equitativo del locus sexual o de la mutación *madC*, aunque son mayores de lo esperado, permiten utilizar los descendientes de ambos cruzamientos para analizar la frecuencia de recombinación entre *madC* y varios SNPs.

2.2.4 Estimación de la frecuencia de recombinación entre cada SNP y el gen *madC*.

Para realizar la localización de *madC* en el genoma se eligieron SNPs de diferentes contigs. En primer lugar, se eligieron cinco SNP localizados en cuatro grupos de ligamiento. De esta manera se podían caracterizar diferentes zonas del genoma de *P. blakesleeanus* para así obtener una pista inicial del lugar del genoma donde pudiera estar *madC*. Posteriormente, se eligieron nuevos SNPs en el grupo de ligamiento donde la frecuencia de recombinación resultó más baja (grupo de ligamiento IV), permitiendo realizar una búsqueda más dirigida (Figura 5). En la primera búsqueda el marcador que presentó menor frecuencia de recombinación con el gen *madC* fue el marcador 7 (25 descendientes recombinantes de 97 descendientes analizados) que identifica que *madC* está en el grupo de ligamiento IV (Figura 2.5).

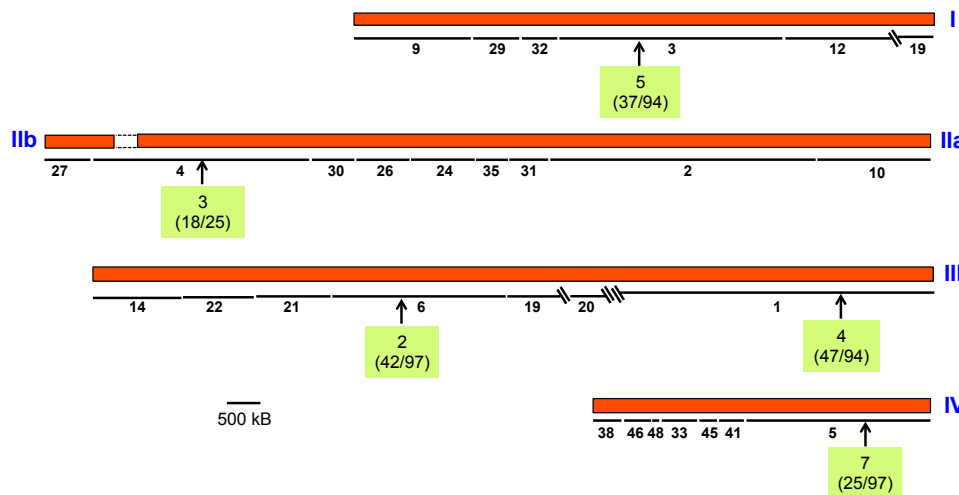


Figura 2.5: Mapa físico de los grupos de ligamiento del genoma de *P. blakesleeanus*. Los números encuadrados en la casilla verde representan los SNPs elegidos para la localización y entre paréntesis el número de descendientes recombinantes entre el total de descendientes analizados para cada marcador. Los grupos de ligamiento están indicados en números romanos y los números sin encuadrar indican el contig.

Posteriormente se procedió a la elección de nuevos marcadores en el grupo de ligamiento IV. La manera de proceder en el mapeo de *madC* siempre se hace de la misma manera. Se elige un SNP, se diseñan cebadores aguas arriba y aguas abajo de dicho SNP y se hace una PCR con los ADNs de todos los descendientes de los distintos cruzamientos. A continuación, se digieren los fragmentos amplificados con la enzima de restricción adecuada y se carga la digestión en un gel de electroforesis donde se compara los patrones electroforéticos de la digestión con el fototropismo de los descendientes. Mediante este procedimiento se va cuantificando el número de descendientes recombinantes entre el SNP seleccionado y el gen *madC* (Figura 2.6). Para el mapeo del gen *madC* se han utilizado en nuestro laboratorio un total de 18 marcadores (SNPs). La localización completa del gen *madC* se ha llevado a cabo en colaboración con el laboratorio del Prof. Alexander Idnurm (University of Missouri-Kansas City).

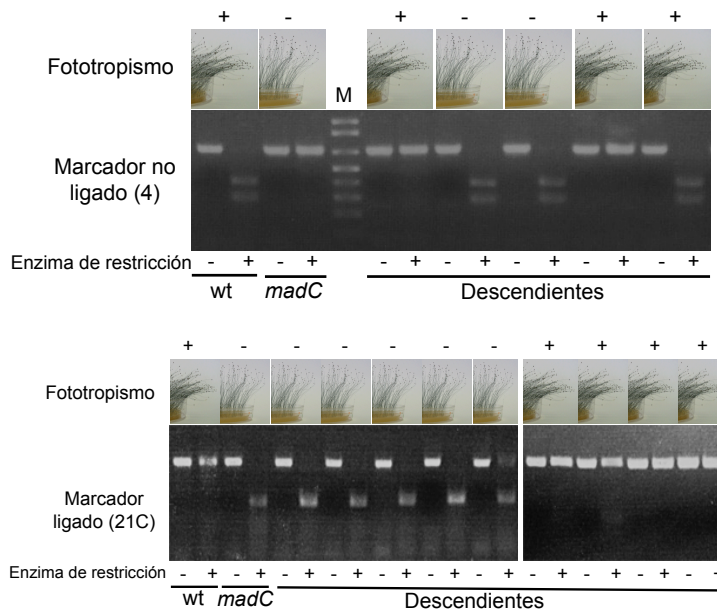


Figura 2.6: Evidencia genética que indica cuándo un marcador (SNP) está o no ligado al gen *madC*. En esta imagen aparecen algunos de los descendientes que fueron examinados, no toda la descendencia. -: indica que el fragmento amplificado no ha sido sometido al proceso de digestión por la enzima correspondiente. +: indica que el fragmento ha sido sometido al proceso de digestión por la enzima correspondiente. Se muestra el patrón de digestión de los parentales. wt se refiere al parental con fondo genético UBC21 y *madC* a los parentales con fondo genético NRRL1555.

En la siguiente tabla (Tabla 2.3) se muestran los resultados obtenidos con todos los marcadores utilizados en esta tesis, su localización en el genoma y la frecuencia de recombinación entre el SNP y el gen *madC*.

Tabla 2.3: Frecuencia de recombinación entre los SNPs seleccionados y el gen *madC* en los descendientes de los cruzamientos entre UBC21 y los mutantes *madC* (B2 y A905).

Nombre marcador	Contig	SNP (v2.0)	Enzima restricción	NRRL1555	UBC21	Desc. Recombinantes/ Desc. analizados	Frecuencia Recombinación
2	6	1427725	EcoRI	A (+)	B (-)	42/97	0,43
3	4	1474019	BamHI	A (+)	B (-)	18/25	0,72
4	1	1269164	EcoRI	A (+)	B (-)	47/94	0,50
5	3	2024210	HindIII	A (+)	B (-)	37/94	0,39
ALID190/191	5	977527	NdeI	A (+)	B (-)	31/82	0,38
7	5	902130	PstI	A (+)	B (-)	25/97	0,25
6D	5	848770	EcoRV	A (-)	B (+)	21/92	0,23
6B	5	758494	HindIII	A (-)	B (+)	22/78	0,28
6H	5	284381	HindIII	A (-)	B (+)	20/93	0,22
ALID393/394	5	557248	EcoRV	A (+)	B (-)	23/84	0,27
ALID1079/1080	5	2201014	EcoRV	A (-)	B (+)	15/92	0,16
21C	5	2015120	HindIII	A (-)	B (+)	6/82	0,07
21I	5	1937421	KpnI	A (+)	B (-)	6/69	0,09
ALID1077/1078	5	1816625	XbaI	A (+)	B (-)	10/77	0,13
ALID1184/1185	41	155605	NdeI	A (-)	B (+)	3/76	0,04
54A	45	247336	EcoRV	A (+)	B (-)	11/77	0,14
54B2	45	196999	EcoRI	A (+)	B (-)	3/61	0,05
ALID1017/1018	45	9911	XhoI	A (-)	B (+)	6/80	0,08

SNP (v2.0): posición del SNP en la base de datos del genoma de *Phycomyces blakesleeanus* versión 2.0. (+): indica que la enzima de restricción utilizada para ese SNP digiere el ADN en esa posición. (-): indica el la enzima de restricción utilizada para ese SNP no digiere el ADN en esa posición. A: indica fondo genético NRRL1555; B: indica fondo genético UBC21. La Frecuencia de Recombinación se muestra en tanto por 1.

En las tablas anteriores se observa que los contigs con menor frecuencia de recombinación son el 5, 41 y 45 (Figura 2.7). Estos resultados indican que el gen debe estar localizado cercano o en uno de estos contigs.

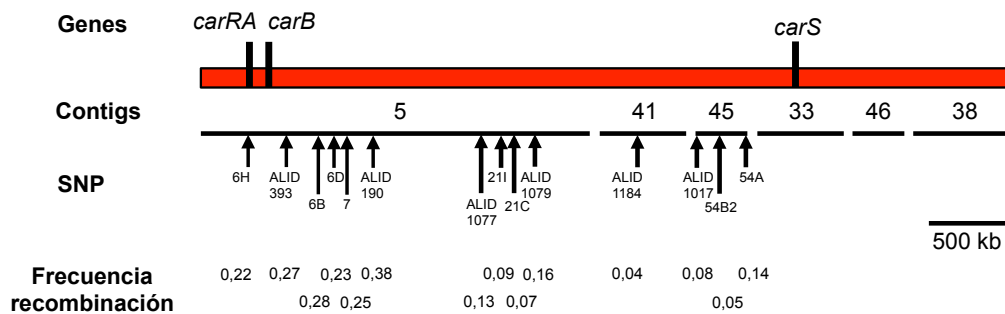


Figura 2.7: Localización del gen *madC*. Mapa físico y de ligamiento entre los genes *carRA*, *carB*, *carS*, y diferentes marcadores (SNP) cercanos al gen *madC*. Los contigs están separados por huecos en la secuencia del genoma. El rectángulo rojo representa el grupo de ligamiento IV. En la figura están anotadas las frecuencias de recombinación obtenido para cada marcador en los descendientes de los cruzamientos entre UBC21 y los mutantes *madC* (B2 y A905).

2.2.5 Identificación del gen *madC*.

Gracias a la colaboración con el laboratorio del Prof. Idnurm, se ampliaron los datos de recombinación entre los marcadores y el gen *madC*. De esta manera se facilitó la identificación del gen *madC* acotando de una forma más precisa y rápida la zona del genoma que contiene dicho gen. La región del genoma de *Phycomyces* donde se localiza *madC* pertenece al contig 33 (versión 2.0 JGI) (figura 2.8). Una vez localizado este contig se rastreó en busca de genes candidatos a ser *madC*. Se secuenciaron varios genes candidatos en todos los mutantes de este gen. Así se encontró un gen que estaba mutado en las estirpes usadas en los cruzamientos, B2 y A905. Posteriormente se comprobaron las demás estirpes mutantes *madC* que también presentaban mutaciones en este gen. Esto indicó que este gen sería el gen *madC*. La identificación del gen *madC* fue llevada a cabo en el laboratorio del Prof. Alexander Idnurm (Polaino et al., 2017).

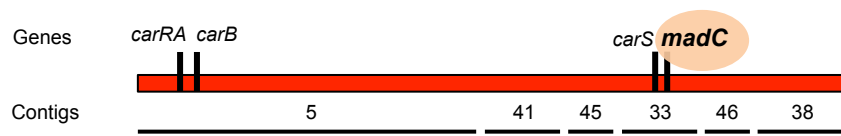


Figura 2.8: Localización del gen *madC*. Mapa físico y de ligamiento entre los genes *carRA*, *carB*, *carS*, y *madC*. Los contigs están separados por huecos en la secuencia del genoma. El rectángulo rojo representa el grupo de ligamiento IV.

El gen identificado como *madC* en *Phycomyces blakesleeanus* codifica para una proteína GTPasa activadora de Ras (GAPs) que pertenece a la superfamilia RasGAP (Polaino et al., 2017). La localización del gen en la base de datos de *P. blakesleeanus* (versión 2.0) lo sitúa en el contig 33 entre los nucleótidos 419316 y 422794, y su protein ID es 118908. Este gen contiene 8 exones y 7 intrones dando lugar a un transcrito de 2313 pb. La proteína está formada por 821 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 93,69 kDa. Esta proteína tiene dos dominios conservados principales llamados RasGAP-GAPA (desde el aminoácido en la posición 174 al 525) y RasGAP-C (desde el aminoácido en la posición 587 al 741) (Figura 10). Existen cinco alelos de *madC* en *P. blakesleeanus* que dan lugar a proteínas MadC truncadas. Los alelos descritos son los siguientes: 1) cambio de una guanina por una alanina en la posición 949 que resulta en un defecto en el procesamiento del tercer intrón, 2) cambio de una guanina por una alanina en la posición 1300 que resulta en un defecto en el procesamiento del cuarto intrón,

3) cambio de la Glu543 por Lys, 4) cambio de la Arg480 por un Stop prematuro, y 5) presencia de un nuevo sitio 3' de procesamiento del intrón 6. Estos cambios en la secuencias del gen *madC* dan lugar a la presencia de stop prematuros y por consiguiente a proteínas aberrantes (Figura 2.9 y 2.10).

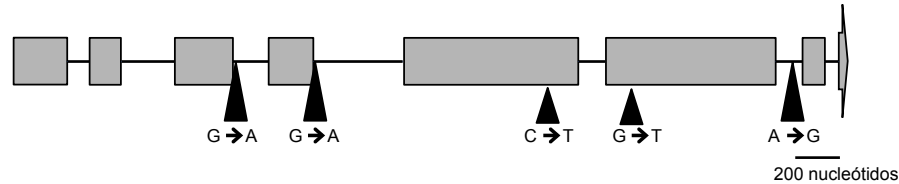


Figura 2.9: Estructura genómica del gen *madC* de *Phycomyces blakesleeanus*. Se indican los exones, intrones y la dirección del transcrito. En cajas grises se representan los exones; mientras que las líneas negras representan los intrones. Los exones e intrones están representados a escala. Los triángulos negros indican las diferentes mutaciones descritas en dicho gen en los distintos mutantes.

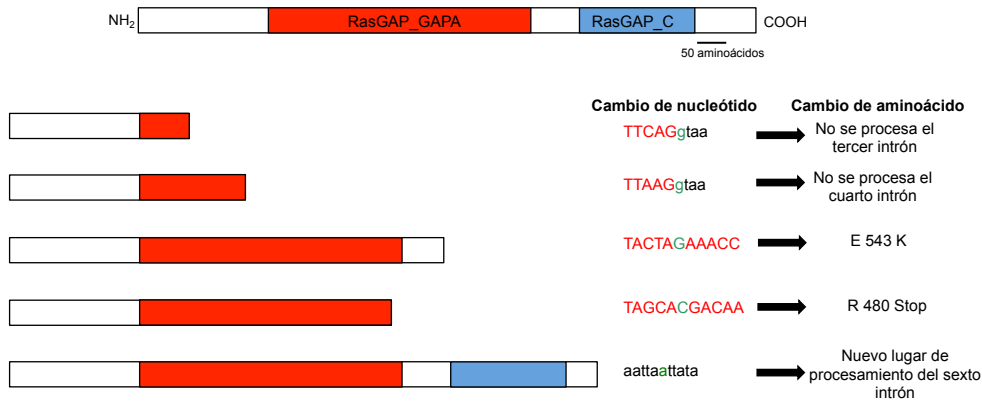


Figura 2.10: Estructura representativa de la proteína GTPasa activadora de Ras (RasGAPs) codificada por el gen *madC* de *P. blakesleeanus* en la estirpe silvestre y en los alelos de los distintos mutantes. Las cajas roja y azul representan los dominios conservados de la proteína. La estructura de la proteína está representada a escala. Los dominios conservados fueron determinados usando el programa NCBI-Blasp.

P. blakesleeanus contiene en su genoma dos proteínas homólogas a MadC cuyos IDs son 130926 y 178156. Estas proteínas pertenecen también a las superfamilia RasGAP. Cuando se comparan las secuencias de aminoácidos de estas proteínas con MadC se observa una identidad del 69,27% y 68,28%, respectivamente. De estas dos proteínas homólogas a MadC no se conocen mutantes.

2.2.6 Transcripción del gen *madC* en *Phycomyces blakesleeanus*.

En *P. blakesleeanus* la luz azul promueve la transcripción de genes que codifican para fotorreceptores (Sanz et al., 2009), los genes implicados en la carotenogénesis (Almeida & Cerdá-Olmedo, 2008) y los genes relacionados con respuestas ambientales como el

gen de choque térmico *hspA* (Rodríguez-Romero & Corrochano, 2004). La transcripción de genes debido a la luz se lleva a cabo por el complejo Mad compuesto por el fotorreceptor MadA y MadB (Sanz et al., 2009).

Para conocer si la transcripción de *madC* depende de la luz y del complejo Mad se hicieron RT-PCR cuantitativas en la estirpe silvestre NRRL1555 y en la estirpe L51 (doble mutante *madA madB*). Para ello, se cultivó el micelio en oscuridad y a diferentes tiempos de luz azul pero no se observó un incremento en la cantidad del ARNm del gen *madC* tras cortos periodos de iluminación (Figura 2.11). En la estirpe mutante con el complejo Mad mutado (doble mutante *madA madB*) se desregula la expresión de *madC* en oscuridad y en micelios iluminados, aumentando los niveles de transcrito en la estirpe mutante. En definitiva, el gen *madC* no es fotoinducible pero se observa que su expresión está influenciada por el complejo Mad de *P. blakesleeanus* ya que cuando éste está mutado aumentan los niveles de transcrito de *madC*.

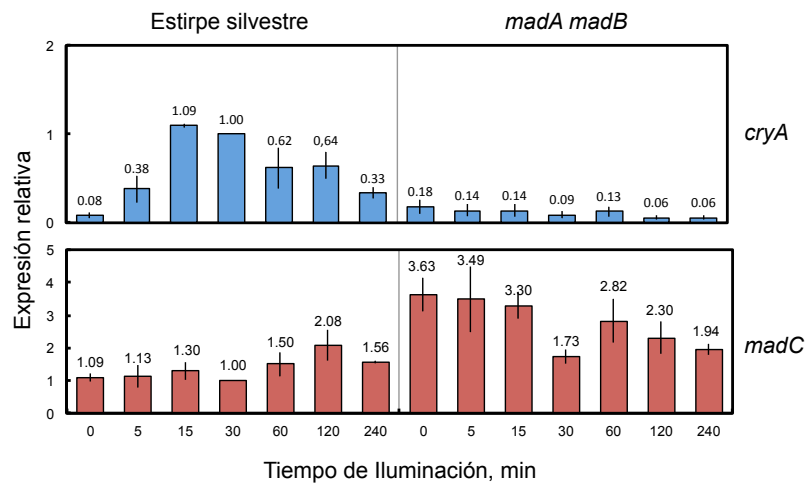


Figura 2.11: Regulación de la transcripción por luz azul del gen *madC* de *P. blakesleeanus*. Los ARNs fueron aislados de micelios iluminados a distintos tiempos de luz azul o recogidos en oscuridad. La cantidad de ARNm para el gen se ensayó mediante RT-PCR cuantitativa. Cada señal de fluorescencia fue normalizada a la correspondiente señal del gen de la actina para corregir los errores de carga y posteriormente la señal obtenida de cada condición y estirpe fue normalizada a la señal de la estirpe silvestre (NRRL1555) a los 30 minutos de iluminación con luz azul. Los datos muestran la expresión relativa de tres experimentos independientes. El número de la parte superior de cada barra de expresión representa el valor medio de los tres experimentos realizados para esa condición en la estirpe correspondiente.

Una vez conocida la expresión del gen *madC* en la estirpe silvestre NRRL1555 y la estirpe mutante *madA madB* (L51) realizamos una RT-PCR cuantitativa del gen *madC* en estirpes mutantes en el gen *madA* (estirpe C47), mutantes en el gen *madB* (C111), y además estirpes mutantes *madC* de cada uno de los alelos descritos del gen. En este caso, la estirpe C47 tiene un alelo distinto del gen *madA* que el doble mutante *madA madB*

(L51). La estirpe C47 tiene una mutación en el gen *madA* que cambia una asparragina por una serina (N132S) afectando el dominio LOV mientras que la estirpe L51 presenta un cambio en el nucleótido 2261 desde el ATG (G/GTAATA a G/ATAATA) impidiendo el procesamiento correcto del último intrón y la pérdida del dominio dedo de zinc (Idnurm et al., 2006). Estos experimentos nos permitirían averiguar si la mutación en el complejo Mad habría desregulado la transcripción de *madC*.

En los resultados obtenidos se confirmó la falta de un efecto significativo de la luz sobre la acumulación de ARNm del gen *madC* en la estirpe silvestre (figura 2.12). En las estirpes mutantes *madA* o *madB* tampoco existe un efecto de la luz sobre la expresión del gen *madC*, aunque la diferencia entre luz y oscuridad es levemente mayor debido a la presencia del complejo Mad truncado. Con respecto a la transcripción del gen *madC* en las estirpes con dicho gen mutado no existe diferencia con respecto a la estirpe silvestre. La única estirpe que tiene un patrón diferente de expresión del gen *madC* es la estirpe S5 que presenta un cambio de nucleótido impidiendo el procesamiento del cuarto intrón del gen, y cuya expresión es igual tanto el luz como en oscuridad y mayor que en la estirpe silvestre aunque la diferencia no parece significativa (Figura 2.12).

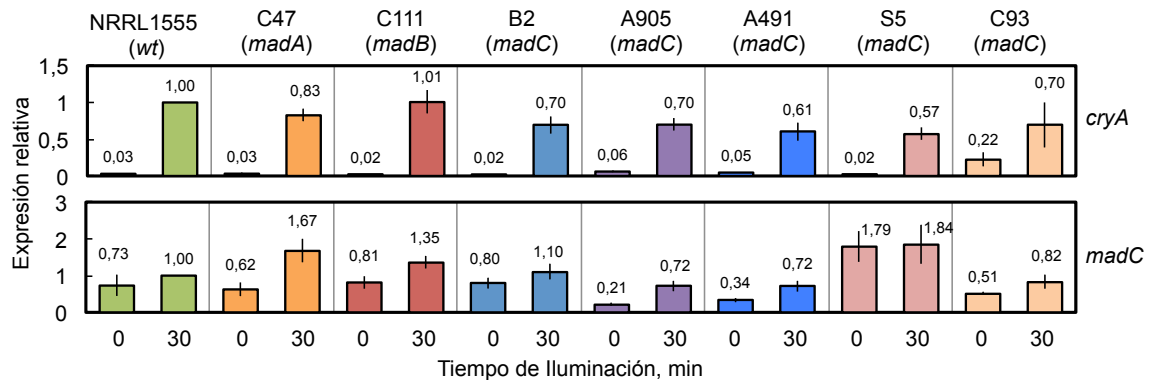


Figura 2.12: Regulación de la transcripción por luz azul de los genes *cryA* y *madC*. Los ARNs fueron aislados de micelio iluminado durante 30 minutos o recogidos en oscuridad. La cantidad de ARNm para cada gen fue ensayada mediante RT-PCR cuantitativa. Cada señal de fluorescencia fue normalizada a la correspondiente señal obtenida con el gen de la actina para corregir los errores de carga y posteriormente la señal obtenida en cada condición y estirpe fue normalizada a la señal de los genes a los 30 minutos de iluminación de la estirpe silvestre (NRRL1555). El gen *cryA* es utilizado como control de la fotoinducción. Los números que aparecen en la parte superior de la barra de expresión, representa el valor medio obtenido para en cada estirpe y condición. Los datos muestran la expresión relativa de tres experimentos independientes.

2.2.7 Transcripción del gen *ira-1* de *Neurospora crassa* homólogo al gen *madC* de *Phycomyces blakesleeanus*.

En *N. crassa* se identificó el gen NCU06122 que se denominará como *ira-1* (Polaino et al., 2017) y que codifica para una GTPasa activadora de Ras que es homólogo

de *madC*. Para conocer si en *N. crassa* la transcripción del gen *ira-1* depende de la luz se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR cuantitativa tras distintos tiempo de iluminación. Para ello, los micelios de *N. crassa* fueron recogidos tras ser iluminados durante diferentes tiempos con luz azul o recogidos en oscuridad.

Los resultados mostraron que en la estirpe silvestre el gen *ira-1* no es fotoinducible (Figura 2.13) aunque entre los treinta minutos de iluminación y la oscuridad haya un pequeño incremento en la transcripción. Este incremento no es suficiente para considerar que la inducción de este gen es dependiente de la luz.

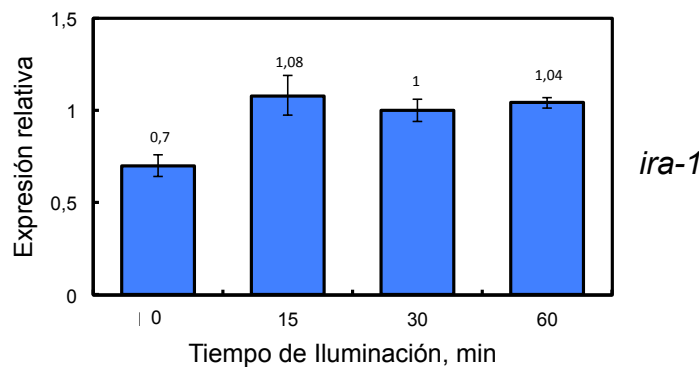


Figura 2.13: Regulación de la transcripción por luz azul del gen *ira-1* en la estirpe silvestre de *N. crassa*. Los ARNs fueron aislados de micelios iluminados a distintos tiempos de luz azul o recogidos en oscuridad. La cantidad de ARNm para cada gen fue ensayada mediante RT-PCR cuantitativa. Cada señal de fluorescencia fue normalizada a la correspondiente señal de la actina para corregir los errores de carga y posteriormente la señal obtenida en cada condición y estirpe fue normalizada a la señal de los genes a los 30 minutos de iluminación de la estirpe silvestre. Los números que aparecen en la parte superior de la barra de expresión representan el valor medio obtenido en cada estirpe y condición. Los datos muestran la expresión relativa de tres experimentos independientes.

2.2.8 Regulación por luz de la proteína IRA-1 de *N. crassa*.

Conocer cuándo y por qué está presente esta proteína en *N. crassa* puede ayudar a elucidar el papel de MadC en *P. blakesleeanus*. También sería interesante comprobar si los datos obtenidos en la transcripción del gen *ira-1* de *N. crassa* se corresponden con los niveles de acumulación de la proteína. Para ello, se etiquetó la proteína IRA-1 con una etiqueta 3XFLAG. Una vez obtenida la estirpe con la proteína IRA-1 etiquetada se determinaron los niveles de la versión etiquetada de IRA-1. La estirpe IRA-1::3xFLAG se cultivó en oscuridad durante 24 horas a 34°C y se iluminó a diferentes tiempos, o se recogieron tras crecer en oscuridad. Las proteínas fueron extraídas y la proteína IRA-1::3xFLAG fue detectada usando un anticuerpo contra FLAG. El tamaño de la proteína IRA-1::3xFLAG es de aproximadamente 92,67 kDa (89,69 kDa IRA-1 sin etiquetar). Como cabía esperar por los datos de transcripción del gen *ira-1* obtenidos en la RT-PCR

cuantitativa la cantidad de IRA-1::3xFLAG no varía en luz con respecto a la oscuridad (Figura 2.14).

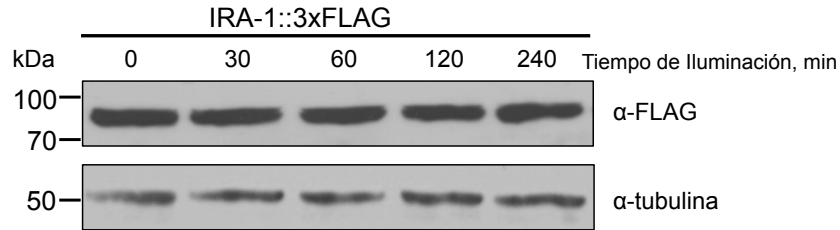


Figura 2.14: Acumulación de IRA-1::3xFLAG. El extracto total de proteínas fue aislado del micelio de la IRA-1::3xFLAG. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en SDS-PAGE, posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y dicha membrana se hibridó con el anticuerpo monoclonal anti-FLAG. La misma membrana fue hibridada con un anticuerpo contra α -tubulina; esta hibridación fue usada como control de carga.

2.2.9 Localización subcelular de la proteína IRA-1::3xFLAG en *N. crassa*.

Para elucidar si la proteína IRA-1 se localiza en el núcleo o en el citoplasma se realizó un fraccionamiento subcelular. Mediante esta técnica se separa la fracción nuclear de la fracción citoplasmática en el micelio vegetativo. Luego mediante la extracción de proteínas de ambas fracciones (nuclear y citoplasmática) se realiza un western blot con un anticuerpo monoclonal anti-FLAG para detectar si la proteína etiquetada se localiza en el núcleo, en la fracción citoplasmática o en ambas fracciones. El fraccionamiento subcelular se llevó a cabo con proteínas que procedían de micelios cultivados en medio líquido crecidos en oscuridad o iluminados 30 minutos con luz blanca. De esta manera se podría comprobar si la cantidad y la localización de la proteína depende o no de la luz.

La proteína IRA-1::3XFLAG se acumula en la fracción citoplasmática tanto en micelios crecidos en oscuridad o iluminados durante 30 minutos con luz blanca. La cantidad de la proteína en luz o en oscuridad no varía como ya hemos observado con el ARNm (Figura 2.15).

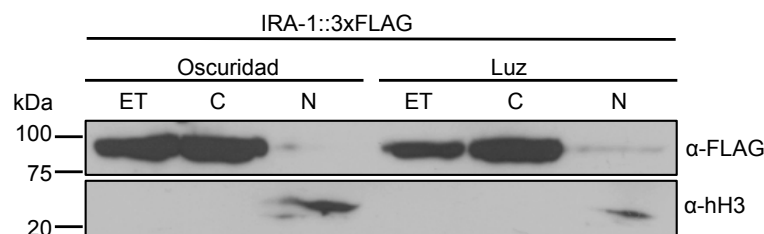


Figura 2.15: Localización citoplasmática de la proteína IRA-1::3xFLAG de *N. crassa*. IRA-1::3xFLAG está localizada en la fracción citoplasmática tanto el luz como en oscuridad. Extracto Total de proteínas (ET), fracción de proteínas citoplasmáticas (C), y fracción de proteínas nucleares (N) fueron aisladas del micelio de la estirpe silvestre, separadas mediante SDS-PAGE, e hibridadas con anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Para confirmar el aislamiento de núcleos se ha utilizado un anticuerpo monoclonal contra la histona H3.

2.2.10 Presencia de la proteína IRA-1 en el estado vegetativo o conidial de *N. crassa*.

IRA-1 está implicada en el ritmo circadiano de *Neurospora*, y el mutante *Δira-1* produce conidios rítmicamente como el mutante *bd* aunque la estirpe *Δira-1* crece más lentamente (Polaino et al., 2017). Para conocer si la proteína IRA-1 se acumula durante la conidiación se extrajeron proteínas del micelio vegetativo y de hifas aéreas de la estirpe etiquetada IRA-1::3xFLAG. Los conidios de dicha estirpe se cultivaron durante 24 horas en medio Vogel líquido tanto en luz como en oscuridad en agitación. Posteriormente, los micelios fueron filtrados, colocados entre dos papeles de filtro sobre la superficie de placas de Vogel con 0,45% de agar. Estas placas fueron incubadas a 30°C en luz o en oscuridad durante 15 o 24 horas. Dos muestras fueron recogidas a cada tiempo, vegetativo (micelio crecido entre los papeles de filtro) y aéreo (hifas crecidas en la superficie del papel de filtro) (Figura 2.16) (Bailey-Shrode & Ebbole, 2004). De esta manera comprobamos si hay o no acumulación de IRA-1::3xFLAG tras 15 ó 24 horas de la inducción de la conidiación.

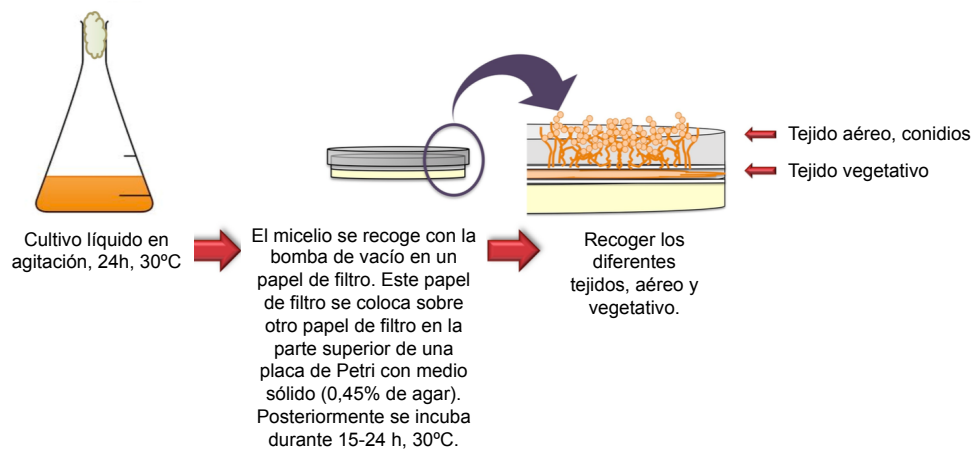


Figura 2.16: Método de inducción al desarrollo en *N. crassa* basado en (Bailey-Shrode & Ebbole, 2004). Modificado de (Ruger-Herreros, 2014).

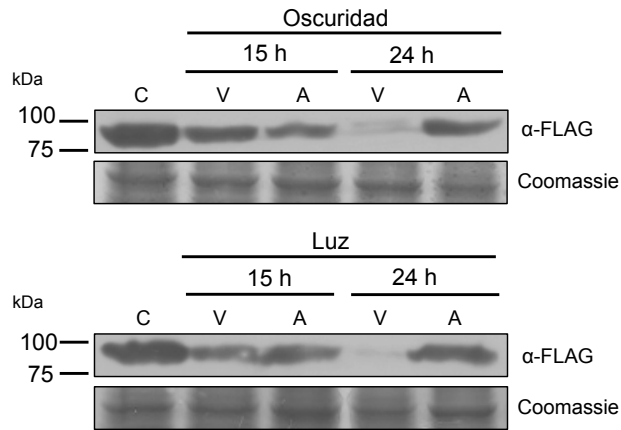


Figura 2.17: Localización de IRA-1::3xFLAG en micelio aéreo y vegetativo. La muestra control (C) corresponde al micelio crecido en medio líquido antes de transferirlo a medio sólido. El micelio vegetativo (V) y las hifas aéreas (A) fueron recogidos a diferentes tiempos (15 ó 24 horas) tras la transferencia. El control de carga fue confirmado mediante tinción con Coomassie.

Se observa que la proteína IRA-1::3xFLAG está presente en hifas aéreas tanto a 15 horas como a 24 horas, pero sólo está presente en micelio vegetativo tras 15 horas después de la inducción de la conidiación (Figura 2.17). En la fracción vegetativa tras 24 horas después de la inducción de la conidiación apenas se acumula IRA-1::3xFLAG.

2.3 Discusión

El esporangióforo de *Phycomyces* es capaz de variar su dirección de crecimiento después de percibir algunos estímulos ambientales como: luz, gravedad, viento y la presencia de objetos cercanos (Cerdá-Olmedo, 2001). Uno de los estímulos más estudiados en este hongo es el fototropismo del esporangióforo que es capaz de responder a la luz azul en un intervalo de intensidad de 10^{-9} a 10^2 W/m² en la estirpe silvestre (Bergman et al., 1969). En *Phycomyces* mediante mutagénesis y análisis genético se identificaron 10 genes con defectos en el fototropismo y otras respuestas a otros estímulos, y se denominaron genes *mad* (Bergman et al., 1973; Campuzano et al., 1995; Orejas et al., 1987). Algunos de estos genes ya han sido identificados, como por ejemplo los genes *madA* y *madB*, que codifican para proteínas del tipo WC-1 y WC-2 de *N. crassa*. MadA y MadB interaccionan formando el complejo fotorreceptor principal en *Phycomyces*, el complejo Mad. De la acción de este complejo depende la fotoinducción de muchos genes en el hongo (Sanz et al., 2009). El gen *madC*, estudiado en este capítulo, es necesario para el fototropismo del esporangióforo pero no es necesario para las respuestas a la luz en el micelio.

Durante mucho tiempo se ha especulado con la idea de que MadC sea un fotorreceptor específico de esporangióforo. Esta hipótesis estaba basada en experimentos biofísicos y genéticos que mostraban cambios en el espectro de acción del mutante *madC* y la interacción entre MadC y MadB (Galland & Lipson, 1985b; Lipson & Teresaka, 1981; Medina & Cerdá-Olmedo, 1977).

Nuestros resultados, en colaboración con el grupo del Prof. Idnurm, han permitido identificar a MadC como una proteína que regula a Ras, no un fotorreceptor. Los datos genéticos y biofísicos que sugieren alguna interacción entre MadC y el complejo fotorreceptor Mad no han podido ser confirmados mediante ensayos de doble híbrido (Polaino et al., 2017), lo que sugiere que la interacción entre estos componentes de la cadena de transducción sensorial debe ser breve y/o débil ya que se espera que la señal luminosa se transfiera de alguna manera a MadC para regular a Ras. Tampoco podemos descartar la existencia de una proteína que sirva de puente entre MadC y el complejo Mad, aunque no se haya podido proponer por la falta del mutante correspondiente.

¿Cómo regula MadC el fototropismo? La identificación de MadC es un hito en la fotobiología de hongos ya que ha permitido identificar a la primera proteína que participa en la cadena de transducción sensorial para el fototropismo después del fotorreceptor. Además, ha permitido colocar el sistema de regulación por Ras en la cadena de transducción sensorial. La mutación de MadC da lugar a la hiperactivación de Ras y, suponemos, el bloqueo de la cadena de transducción desde el fotorreceptor hasta las sintetetasas de quitina que gobiernan el crecimiento de la pared celular. Es posible que la proteína Ras cuya actividad está regulada por MadC interaccione con una sintetasa de quitina para modular su actividad, o que regule a otras proteínas que participan en la regulación de la sintetasa de quitina o del crecimiento de la pared celular. Esperamos que la identificación de otros genes *mad* o la identificación de proteínas que interaccionan con Ras puedan ayudar a completar la cadena de transducción sensorial para el fototropismo de *Phycomyces*.

Existen muchos ejemplos en los que Ras y sus proteínas reguladoras participan en procesos claves de la vida de la célula, también en hongos. De hecho, en *Aspergillus fumigatus* se ha descubierto un dominio N-terminal en la proteína RasA que tiene desde dos a ocho aminoácidos terminando en una arginina invariable. Este dominio parece ser

esencial para la morfogénesis polarizada y el desarrollo asexual del hongo. Además, este dominio no está presente en los homólogos de *rasA* de eucariotas superiores. Mutaciones en este dominio afectó la interacción con una GTPasa de tipo Rho y disminuyó la activación de la proteína quinasa A (PKA) provocando cambios en la traducción de señales (Abdallah et al., 2016). Se ha comprobado que la mutación de genes homólogos a *madC* de *Phycomyces* en otros hongos tienen efectos severos, como por ejemplo problemas en el crecimiento y desarrollo en el basidiomiceto *Schizophyllum commune* (Schubert et al., 2006) y en el ascomiceto *Aspergillus nidulans* afectando al citoesqueleto de actina y a la polaridad (Harispe et al., 2008). En *Aspergillus nidulans*, la proteína GapA, homóloga a MadC de *Phycomyces*, actúa en parte regulando la actividad de Ras pero también tiene funciones independientes de Ras como le ocurre a la proteína de mamíferos p120-RasGAP que participa en la regulación de la motilidad celular (Harispe et al., 2008; Kulkarni et al., 2000).

En *Neurospora*, una mutación de Ras permite detectar la regulación de la conidiación por el ritmo circadiano (Belden et al., 2007b). En *Phycomyces*, la mutación en la RasGAP (MadC) disminuye la sensibilidad a la luz para el fototropismo de los esporangióforos. Es interesante comprobar cómo dos rutas de transducción sensorial tan diferentes en hongos poco emparentados tienen en común la regulación por Ras.

La delección del homólogo de MadC en *Neurospora* da lugar a una alteración del ritmo circadiano (Polaino et al., 2017) y a una menor sensibilidad a la luz (Luque, E; com. pers.). Nuestros resultados de experimentos de localización celular indican que es una proteína citoplásmica que debe interaccionar con Ras para regular su actividad. Su acumulación en conidios indica un papel importante en la germinación y el crecimiento de la hifa, seguramente para participar en la regulación del ritmo circadiano a través de Ras.

La conservación en la secuencia de aminoácidos entre MadC e IRA-1 permite suponer que MadC podría complementar la función de IRA-1 en *Neurospora*. Introducir la proteína MadC en el mutante *ira-1* de *Neurospora* permitiría continuar explorando la función de MadC e identificar posibles proteínas con las que interaccione para avanzar en nuestro conocimiento del papel de las proteínas RasGAP en la transducción sensorial en hongos.

Capítulo 3

El gen *carC* de *Phycomyces blakesleeanus*

3.1 Introducción

En algunos hongos del orden Mucorales se ha investigado en detalle la biosíntesis de carotenos, concretamente en los cigomicetos *Phycomyces blakesleeanus*, *Blakeslea trispora* y *Mucor circinelloides* (Avalos & Limón, 2015). El principal producto final de la ruta de síntesis de los carotenoides es el β -caroteno, que es uno de los carotenos más abundantes de la naturaleza (Zeilinger et al., 2015). La ruta de biosíntesis de carotenos se ha descrito en la introducción de esta tesis, sección 2.4.3.1.

3.1.1 Las geranilgeranil pirofosfato sintasas (GGPPS).

La ruta de síntesis de carotenos (Figura I.11) comienza con la biosíntesis del geranilgeranil pirofosfato (GGPP). Para ello es necesario la intervención de la enzima geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS) que pertenecen a la familia de las E-prenil transferasas. Estas enzimas catalizan la condensación consecutiva de IPP (Isopentenil pirofosfato) con difosfatos prenil-alílicos produciendo cadenas hidrocarbonadas con diferentes longitudes según la enzima (Hemmi et al., 2003). Estas moléculas son utilizadas para sintetizar los precursores de numerosos tipos de compuestos isoprenoides como esteroides, carotenoides, quinonas respiratorias y proteínas preniladas (Koyama, 1999; Ogura & Koyama, 1998). Las E-prenil-transferasas han sido clasificadas en tres grupos basados en su estructura cuaternaria y en la longitud del compuesto hidrocarbonado que sintetizan: de cadena corta (C_{10-25}), media (C_{30-35}) y larga (C_{40-50}) (Hemmi et al., 2003; Ogura & Koyama, 1998). Las GGPPS están incluidas en el grupo de las E-prenil transferasas de cadena corta ya que los productos originados contienen entre 10 y 20 átomos de carbono (Hemmi et al., 2003).

Las GGPPS contienen cinco dominios conservados designados I-V (Figura 1) (Chen & Poulter, 1994). La fracción difosfato de los sustratos alílicos DMAPP (Dimetilalil-pirofosfato)/ GPP (Geranil pirofosfato)/ FPP (Farnesil pirofosfato) se unen mediante iones Mg^{2+} a los dos motivos ricos en aspartato, DDXX(XX)D y DDXXD (donde X representa cualquier aminoácido), presentes en la región I y V, respectivamente. Estos dominios son conocidos como dominio FARM (First Aspartate-Rich Motif) y SARM (Second Aspartate-Rich Motif), respectivamente. La región III contiene el motivo GQXXD que está también implicado en la unión de los sustratos alílicos. La unión de la

fracción difosfato del sustrato IPP implica a los residuos básicos presentes en la región I que contiene el motivo GKXXR. Los residuos de lisina y treonina conservados de los motivos KT de la región IV participan en la catálisis por la activación del grupo difosfato y la posterior estabilización del carbocatión del intermediario formado durante la catálisis (Saikia et al., 2008).

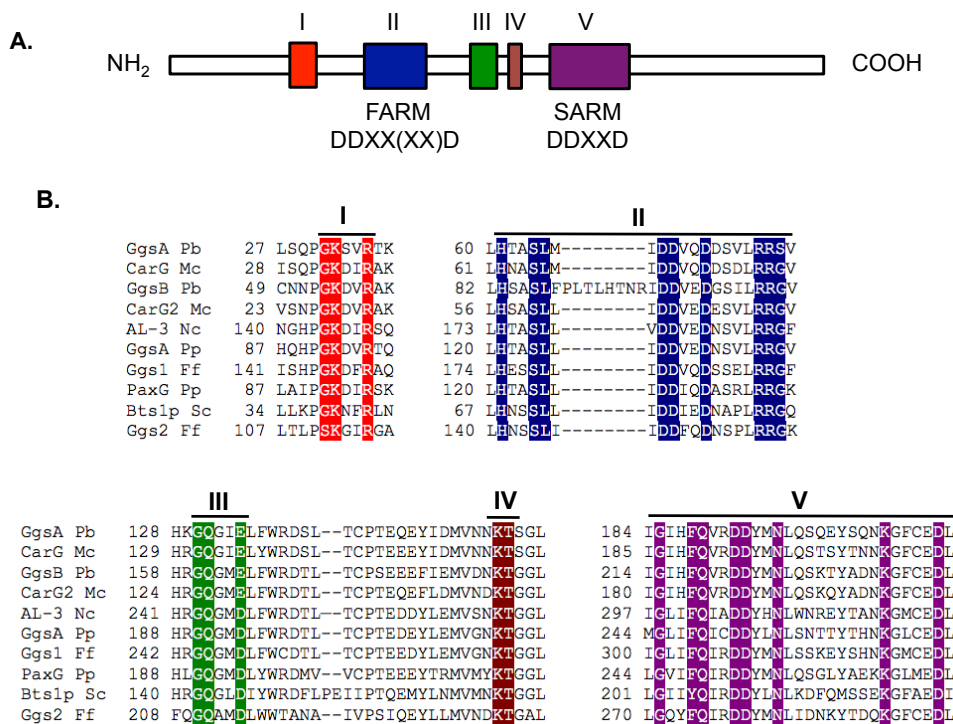


Figura 3.1: Regiones conservadas de varias GGPPS. A. Estructura representativa de las E-preniltransferasas mostrando los cinco regiones conservadas incluyendo el motivo FARM y el motivo SARM. B. Alineamiento de regiones conservadas de GGPPS de hongos, resaltando los aminoácidos conservados de cada región. Los números indican la posición del primer aminoácido. Secuencias de la GGPPS de *Phycomyces blakesleeanus* (Pb), *Mucor circinelloides* (Mc); *Neurospora crassa* (Nc), *Penicillium paxilli* (Pp), *Fusarium fujikuroi* (Ff) y *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Las secuencias de proteínas fueron alineadas usando el programa ClustalX con los parámetros por defecto (Tagua, 2012).

Los genomas de algunos hongos filamentosos como *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Neotyphodium lolii*, *Fusarium graminearum* y *F. fujikuroi* tienen dos o más copias de genes que codifican para GGPPS. La presencia de varias copias de genes para las GGPPS sugiere una “firma molecular” para la biosíntesis de diterpenos y podría significar que la ruta de biosíntesis que utilizan estas enzimas podría estar compartimentalizada con GGPPS especializadas para la biosíntesis de terpenoides en diferentes compartimentos (Saikia & Scott, 2009).

3.1.2 Las GGPPSs de *Phycomyces*.

Phycomyces blakesleeanus también tiene dos genes que codifican para GGPPS llamados *ggsA* y *ggsB* (Tagua, 2012) (Figura 2). Estas proteínas son homólogas de la proteína AL-3 de *Neurospora crassa* y de la proteína CarG de *Mucor circinelloides* que participan en la ruta de biosíntesis de carotenos (Nelson et al., 1989; Velayos et al., 2003).

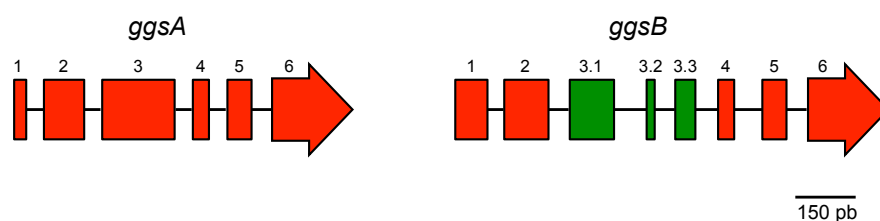


Figura 3.2: Estructura genómica de los genes que codifican para las GGPPS de *Phycomyces blakesleeanus*. Se indican los exones, los intrones y la dirección de la transcripción. En cajas rojas se indican los exones de cada gen. Las cajas verdes muestran el exón 3 que se encuentra interrumpido por dos intrones en *ggsB*. Imagen modificada de la Tesis de Víctor G. Tagua, 2012.

El gen *ggsA* tiene una longitud de 1176 pb y contiene 5 intrones y 6 exones, y el gen *ggsB* tiene una longitud de 1530 pb y contiene 7 intrones y 8 exones. La estructura genómica de los dos genes es muy parecida, excepto el exón 3 de *ggsA* que está dividido por dos intrones en *ggsB* después de la duplicación para dar lugar a estos dos genes (Figura 2). La duplicación de los genes para las GGPPS también se observa en otros mucoromicetos como *Mucor* y *Rhizopus* sugiriendo que estos genes aparecieron por una duplicación del gen para la GGPPS en el antepasado de estos hongos. El análisis del genoma de varios hongos mucoromicetos ha demostrado que durante la evolución de estos hongos ocurrió una duplicación de su genoma (Corrochano et al., 2016). Este fenómeno puede ser responsable de las dos copias de genes para GGPPS que existen en los genomas de varios hongos mucoromicetos igual que se ha propuesto para la duplicación de genes de fotorreceptores y otras proteínas que participan en transducción sensorial (Corrochano et al., 2016).

Las proteínas GgsA (JGI ID protein # 33722) y GgsB (JGI protein # 183831) tienen 299 y 322 aminoácidos respectivamente. Las dos proteínas tienen un 91.6% de identidad y contienen los cinco dominios característicos de las GGPPS (Figura 1) (Chen & Poulter, 1994). GgsA y GgsB pertenecen a la familia de las GGPPS de tipo III debido a su secuencia y estructura (Tagua, 2012).

La GGPPS ha sido purificada del mutante M1 (mutante *carS* superproductor de caroteno) de *Phycomyces blakesleeanus* debido a la alta actividad GGPPS que se detectaba

en este mutante (Brinkhaus & Rilling, 1988). La GGPPS de *Phycomyces* consiste en dos subunidades de aproximadamente 30 kDa con tendencia a disociarse. No está claro si las dos subunidades purificadas corresponden a dos subunidades de GgsA, dos subunidades de GgsB o a un heterodímero de GgsA y GgsB, ya que las proteínas GgsA y GgsB tienen un tamaño similar, 34,06 y 36,73 kDa respectivamente. También se ha observado que la enzima purificada utiliza como sustrato IPP y FPP para la formación de GGPP (Brinkhaus & Rilling, 1988).

3.1.3 Regulación de la transcripción de los genes *ggsA* y *ggsB*.

La transcripción de los genes *ggsA* y *ggsB* está regulada por la luz y el desarrollo sexual. Para conocer cómo la luz regula la transcripción de los genes implicados en carotenogénesis se estudió la transcripción de los genes *ggsA*, *ggsB*, *carRA* y *carB*, *carS* y *acaA*. Cuando los micelios se exponen a diferentes tiempos de iluminación con luz azul se ha observado la inducción de la transcripción de los genes *ggsA*, *carRA* y *carB*, y la represión de *ggsB* y *carS* (Tagua, 2012). Sin embargo, el gen *acaA* no responde a la exposición a luz azul. La mayor acumulación de ARNm de *ggsA* ocurre tras 15-30 minutos de exposición a luz azul (10 veces más acumulación que en oscuridad), pero exposiciones más prolongadas dan lugar a una disminución de ARNm. En cambio, *ggsB* y *carS* se reprimen por la luz y la máxima represión se detecta tras 60 minutos de iluminación. La activación o represión transitoria se deben a la fotoadaptación que ha sido observada para varios genes regulados por luz en *Phycomyces* (Rodríguez-Romero & Corrochano, 2006; Sanz et al., 2009; Tagua et al., 2015). La regulación por luz tanto para la activación como para la represión de estos genes está mediada por el complejo Mad que está formado por los productos de los genes *madA* y *madB* (Bergman et al., 1973; Idnurm et al., 2006; Sanz et al., 2009). Los mutantes del complejo Mad no son capaces de regular la transcripción de los genes *ggsA*, *ggsB* o *carS* por la luz (Tagua, 2012).

En *Phycomyces blakesleeanus* la carotenogénesis también se induce por la interacción sexual (Barnett et al., 1956). Se ha investigado la expresión de los genes *ggsA*, *ggsB*, *carS*, *carRA*, *carB* y *acaA* en cultivos mixtos y en cultivos simples. La transcripción de estos genes se activa por el sexo excepto la transcripción de *ggsA* que se reprime dando lugar a una acumulación de ARNm dos veces menor en cultivos mixtos que en cultivos simples. La cantidad de ARNm de *carS* es 12-15 veces mayor en cultivos mixtos que en

cultivos simples, y en el caso de *ggsB* es de 30-35 veces mayor en cultivos mixtos que en cultivos simples. Por tanto, parece que *ggsA* se activa por luz y participa en la activación de la biosíntesis de carotenos por la luz mientras que *ggsB* se activa por la interacción sexual para que GgsB participe en la síntesis de carotenos durante el desarrollo sexual de *Phycomyces blakesleeanus* (Tagua, 2012).

3.1.4 El gen *carC*.

Los mutantes en el gen de la GGPPS de *N. crassa* son letales debido al papel de estas proteínas en la biosíntesis de terpenoides esenciales (Macino et al., 1993). Sin embargo, existen mutantes en el gen responsable de la GGPPS de *Neurospora* (*al-3*) que son rezumantes. Estos mutantes tienen un fenotipo albino por la reducción en la biosíntesis de carotenoides como resultado de una GGPPS que no es completamente activa (Macino et al., 1993). Los mutantes en el gen *carC* tienen un color blanquecino por su escasa acumulación de β -caroteno y el producto de este gen ha sido propuesto como regulador de la ruta de biosíntesis de carotenos. Además, los mutantes *carC* son defectuosos en la fotocarotenogénesis pero el retinol es capaz de estimular la carotenogénesis del mutante *carC* tanto como la estirpe silvestre (Revuelta & Eslava, 1983).

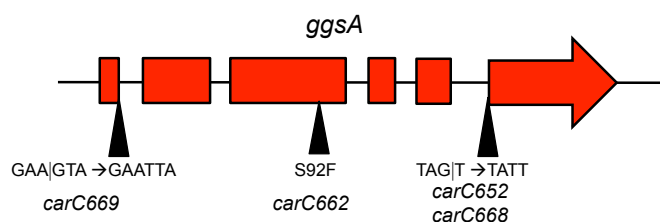


Figura 3.3: Estructura genómica del gen *ggsA* de *P. blakesleeanus*. La flechas negras indican las diferentes mutaciones descritas en el gen *ggsA*.

Para investigar si los genes *ggsA* o *ggsB* correspondían a *carC*, Víctor G. Tagua (2012) secuenció estos genes en varios mutantes *carC* y encontró que todos los mutantes *carC* tenían mutaciones en el gen *ggsA* (Tagua, 2012). Se identificaron tres alelos diferentes del gen *ggsA*. El alelo *carC669* tiene una transición de G a T en el nucleótido 43 que altera el procesamiento del primer intrón originando un stop prematuro que da como resultado una proteína truncada de 35 aminoácidos. Las estirpes con la mutación *carC652* y *carC668* contienen una transición de G a T en el nucleótido 879 que altera el procesamiento del quinto intrón originando un stop prematuro y una proteína truncada

de 211 aminoácidos. Por último, el alelo *carC662* tiene una mutación (TCT a TTT) que reemplaza la serina en la posición 92 por una fenilalanina. Esta mutación no está localizada en ninguno de los cinco dominios de las GGPPS, pero podría ser esencial para el funcionamiento correcto de la proteína ya que estos mutantes tienen el mismo fenotipo que otros mutantes *carC* (Revuelta & Eslava, 1983).

Los resultados obtenidos en la tesis doctoral de Víctor G. Tagua sugieren que el gen *ggsA* es *carC* (Tagua, 2012). En este capítulo estudiaremos el ligamiento de las mutaciones en *ggsA* con el fenotipo observado en los mutantes *carC* mediante análisis genético. Además investigaremos la actividad enzimática de las GGPPS de *Phycomyces blakesleeanus* utilizando sistemas heterólogos para la expresión de genes usando la bacteria *E. coli* y el hongo ascomiceto *N. crassa*. Nuestros resultados nos han permitido confirmar que CarC es una GGPPS.

3.2 Resultados

3.2.1 Ligamiento entre la mutación *carC* y el gen *ggsA*.

Estudios previos del laboratorio realizados por el Dr. Víctor G. Tagua, determinaron que todos los mutantes *carC* de *P. blakesleeanus* tenían una mutación en el gen *ggsA*. Los tres alelos del gen *carC* producen ARNm de distintos tamaños dependiendo de cada mutación (Figura 3.4).

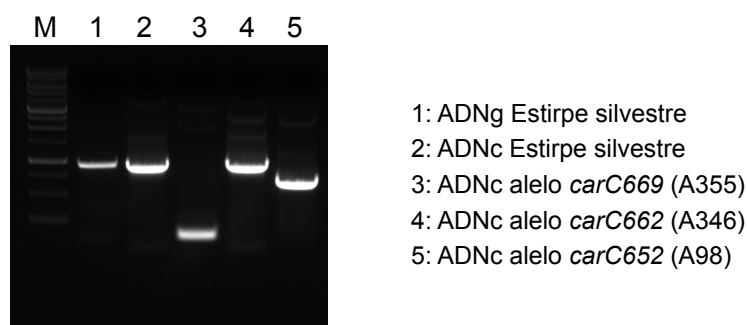


Figura 3.4: Amplificación del gen *carC* en la estirpe silvestre NRRL1555 y en los diferentes alelos (mutantes *carC*) de dicho gen de *Phycomyces*.

La mutación en el gen *carC* da lugar a un micelio menos amarillo debido a la escasez de β -caroteno (Figura 3.5) (Revuelta & Eslava, 1983).

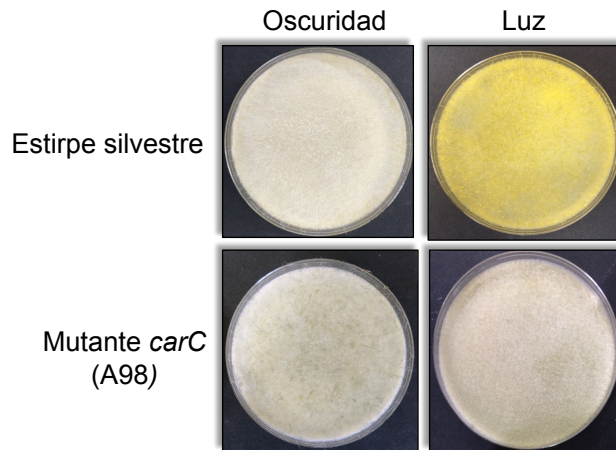


Figura 3.5: Aspecto de *Phycomyces* en la estirpe silvestre (A56) y el mutante *carC* (A98) crecidos 48 horas en oscuridad y expuestos posteriormente a la luz.

La falta de β -caroteno en los mutantes *carC* y el hecho de que todos los mutantes *carC* tengan mutaciones en *ggsA* apoyan la hipótesis de que *ggsA* corresponde a *carC* (Tagua, 2012). Para confirmar esta hipótesis investigamos el ligamiento entre el fenotipo *carC* y el gen *ggsA*. Para ello, se hicieron dos cruzamientos sexuales entre la estirpe silvestre (A56) y dos mutantes *carC* (A98 y A346) (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Secuencia de nucleótidos del gen *ggsA* en la sección donde se encuentran las mutaciones en los mutantes *carC*, A98 y A346. El exón se muestran en mayúsculas y el intrón en minúsculas. Los nucleótidos resaltados en verde indican la mutación.

Estirpe	Alelo	Secuencia relevante en <i>ggsA</i>	Efecto de la mutación en <i>ggsA</i>
A56 (silvestre)		catttagTATTCT	-
A98 (<i>carC</i>)	<i>carC652</i>	cattttaTATTCT	No procesa el intrón 5
A346 (<i>carC</i>)	<i>carC662</i>	CCCAATTTATC	Cambio de Ser 92 por Phe

De estos cruzamientos se obtuvieron 74 descendientes que proceden de 16 cigosporas. De una misma cigospora se recogieron varios descendientes al azar (Tabla 3.2) (Figura 3.6).

Tabla 3.2: Descendencia obtenida en los cruces realizados entre la estirpe silvestre y los mutantes *carC*.

Cruces	Nº cigosporas	Germosporas	Descendientes amarillos	Descendientes blancos
A56 x A98	9	33	26	7
A56 x A346	7	41	28	13
TOTAL	16	74	54	20

Se seleccionaron todos los descendientes, se amplificó el gen *ggsA* mediante PCR con cebadores específicos, se secuenciaron los fragmentos amplificados de cada descendiente y se analizaron las secuencias para confirmar si tenían mutado el gen *ggsA* (Figura 3.6).

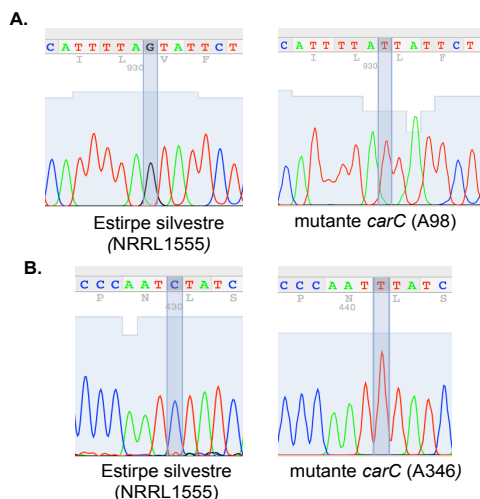


Figura 3.6 : Análisis de las secuencias de una región del gen *ggsA* en los descendientes de los cruzamientos entre la estirpe silvestre y mutantes *carC*. Se muestra el nucleótido que está mutado en los parentales silvestre A56 y mutante A98 (A) y los parentales silvestre A56 y mutante A346 (B).

Posteriormente se comparó el resultado de la secuenciación con el fenotipo del micelio, amarillo o blanco, dependiendo de la ausencia o acumulación de β -caroteno. El resultado obtenido confirmó que la mutación del gen *ggsA* de *P. blakesleeanus* va ligada al fenotipo *carC* y, por tanto, a la pérdida de la producción de β -caroteno en el micelio del hongo. Esto es debido a que todos los descendientes con el gen *ggsA* mutado presentaron un micelio blanco (20 descendientes) y todos los descendientes con el gen silvestre presentaron un micelio amarillo (54 descendientes). Los resultados confirman la hipótesis inicial y nos permite afirmar que *ggsA* es *carC* (Figura 3.7).

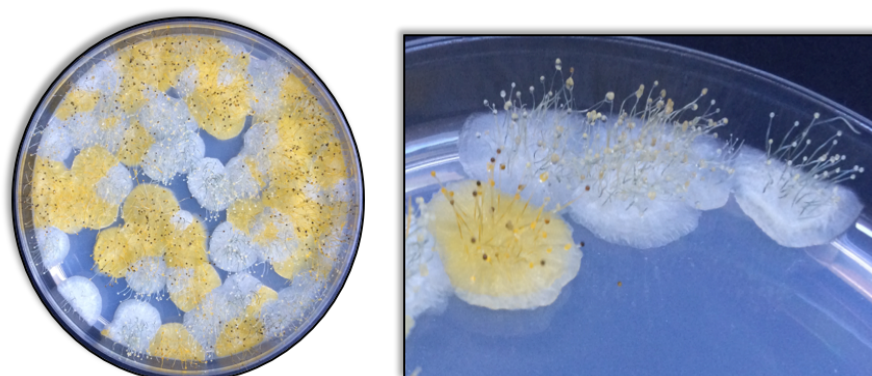


Figura 3.7: Colonias procedentes de una cigospora originada de los cruzamientos entre las estirpes silvestres y los mutantes *carC*. Las colonias de color amarillo no tienen el gen *ggsA* mutado y las colonias blancas tienen el gen *ggsA* mutado. Las germosporas se inocularon en medio mínimo ácido para permitir el crecimiento colonial del hongo.

3.2.2 Complementación de los genes *carC* y *ggsB* de *P. blakesleeanus* en *E. coli*.

Para confirmar la naturaleza molecular de las actividades codificadas por los genes *carC* y *ggsB* hemos utilizado un sistema heterólogo para la expresión de genes usando la bacteria *E. coli*. La transformación de *E. coli* con un plásmido que contiene los genes *crt* de *Erwinia uredovora* permite la síntesis y la acumulación de diferentes carotenoides en la bacteria (Misawa et al., 1990).

El genoma de la bacteria *E. uredovora* 20D3 ATCC 19321 (Thiry, 1984) contiene un fragmento de ADN de 6,9 kb con seis ORFs (genes *crt*) responsables de la transformación de geranilgeranil pirofosfato (GGPP) en zeaxantina- β -diglucósido (Misawa et al., 1990). Los genes *crt* son *crtE*, *crtX*, *crtY*, *crtI*, *crtB* y *crtZ* y codifican para las siguientes enzimas: GGPP sintasa (*crtE*), zeaxantina glucosil-transferasa (*crtX*), licopeno ciclasa (*crtY*), fitoeno deshidrogenasa (*crtI*), fitoeno sintasa (*crtB*) y β -caroteno hidrolasa (*crtZ*) (Misawa et al., 1990) (Tabla 3.3)(Figura 3.8). La eliminación o inactivación de uno o varios de estos genes bloquea la síntesis de carotenoides.

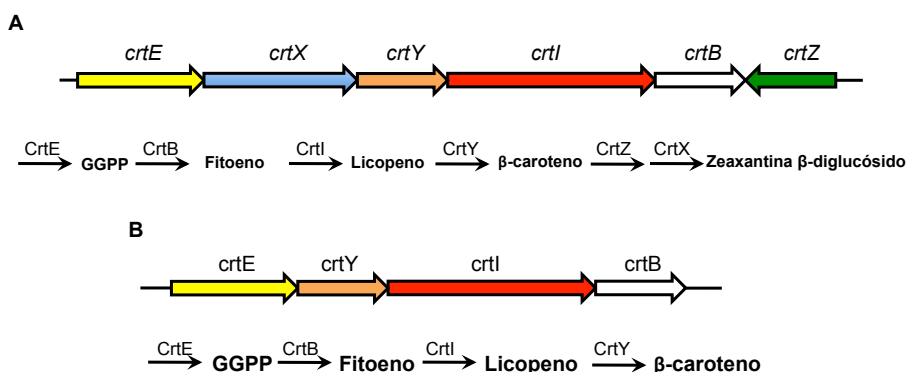


Figura 3.8: Organización esquemática de los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en *Erwinia uredovora*. A. Genes estructurales y pasos enzimáticos implicados en la biosíntesis de carotenoides en *E. uredovora*. B. Genes implicados en la producción de β -caroteno en *E. coli* que se usarán como sistema heterólogo para comprobar la complementación de genes de la carotenogénesis.

Para ensayar la complementación en *E. coli* DH5 α se transforma la bacteria con un plásmido que contiene los genes *crtE*, *Y*, *I* y *B* que permiten la síntesis de β -caroteno a partir de GGPP dando lugar a colonias de color amarillo (Ruiz-Hidalgo et al., 1999; Sanz et al., 2011b; Velayos et al., 2000). Como estamos interesados en conocer si los genes *carC* y *ggsB* dan lugar a proteínas con actividad GGPPS usamos un plásmido que carece del gen *crtE* y, además, transformamos con el plásmido pGEM-T que lleva clonado los ADNc de *carC* o *ggsB* bajo el promotor de la T7 ARN polimerasa (Figura 3.9). La acumulación de β -caroteno en la estirpe de *E. coli* sin *crtE* pero con *carC* o *ggsB*

permitirá confirmar que las enzimas de *Phycomyces* tienen actividad GGPPS y complementan la falta de CrtE en la biosíntesis de β -caroteno..

Tabla 3.3: Genes de la biosíntesis de carotenos en *E. uredovora* y sus homólogos en *P. blakesleeanus*

Genes de <i>E. uredovora</i>	Genes de <i>P. blakesleeanus</i>	Proteína
<i>crtE</i>	<i>carC</i> y <i>ggsB</i>	GGPP sintasa
<i>crtB</i>	<i>carA</i>	Fitoeno sintasa
<i>crtI</i>	<i>carB</i>	Fitoeno deshidrogenasa
<i>crtY</i>	<i>carR</i>	Licopeno ciclasa
<i>crtX</i>	-	Zeaxantina glucosil transferasa
<i>crtZ</i>	-	β -caroteno hidrolasa

En primer lugar, se amplificó y clonó el ADNc del gen *carC* en el plásmido pGEMT y además se introdujo en la bacteria otro plásmido con el grupo de genes *crt* procedentes de *Erwinia uredovora* excepto *crtE*, el gen homólogo bacteriano de *carC* (Figura 3.9).

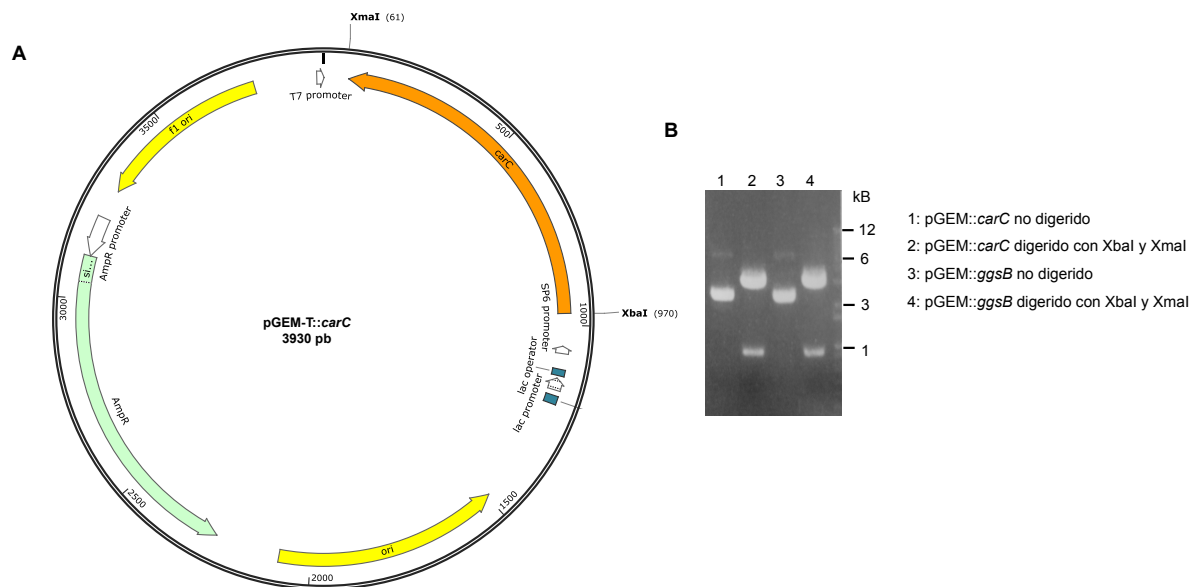


Figura 3.9: A: Esquema del plásmido pGEM-T con el gen *carC* o *ggsB* de *P. blakesleeanus*. B: Comprobación de la clonación del gen *carC* en el plásmido pGEM-T mediante digestión con las enzimas de restricción XbaI-XmaI. El carril 1 de la electroforesis corresponde al plásmido pGEM-T::carC sin digerir mientras que en el carril 2 aparece una banda de 3 kb que corresponde al plásmido pGEM-T y otra banda de 0,9 kb que corresponde al gen *carC*. El carril 3 de la electroforesis corresponde al plásmido pGEM-T::ggsB sin digerir mientras que en el carril 4 aparece una banda de 3 kb que corresponde al plásmido pGEM-T y otra banda de 0,9 kb que corresponde al gen *ggsB* de *P. blakesleeanus*.

A continuación, realizamos experimentos de cotransformación utilizando los ADNc de *carC* y *carRA* junto con el grupo de genes *crt* excepto *crtE* y *crtY* con el objetivo de averiguar si la presencia de otras proteínas Car de *Phycomyces* permitirían un mejor acoplamiento de CarC en la biosíntesis de carotenos en *E. coli*. Este tipo de experimentos ya fueron realizados con los genes *carB* y *carRA* de *Phycomyces* y se comprobó que estos genes complementaban la falta de los genes *crt* homólogos en *E. coli*, *crtI* y *crtY* respectivamente (Sanz et al., 2011b).

Para caracterizar el contenido de carotenos sintetizados tras cada experimento de cotransformación se analizaron mediante HPLC los extractos de carotenos de cada estirpe de *E. coli* y se cuantificó la cantidad de carotenos obtenidos en cada estirpe (Figura 3.10 y 3.11).

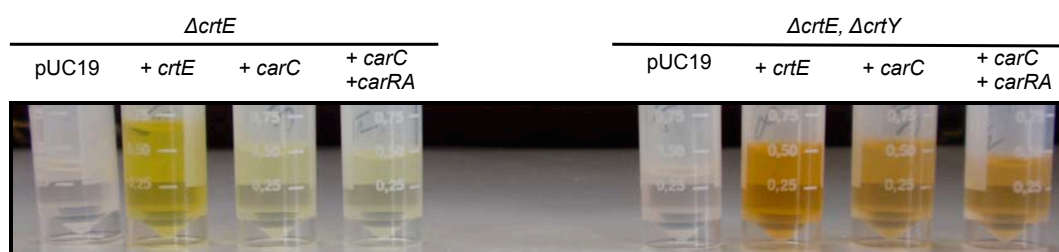


Figura 3.10: Extractos de carotenos procedentes de las estirpes de *E. coli* después de realizar las distintas cotransformaciones entre los genes *crt* de *E. uredoovora* y los genes *carC* y *carRA* de *P. blakesleeanus*. $\Delta crtE$: control negativo; + *crtE*: control positivo. Imagen cortesía de la Dra. Catalina Sanz.

En todos los experimentos transformamos *E. coli* DH5 α con 2 ó 3 plásmidos seleccionando la resistencia a cloranfenicol, ampicilina o tetraciclina según corresponda. En todos los casos transformamos *E. coli* usando un plásmido con el grupo de genes de *E. uredoovora* que permite sintetizar β -caroteno excepto *crtE* (estirpes con el plásmido pAVB3) o sin *crtE* y sin *crtY* (estirpes con el plásmido pAVB14). Para simplificar denominaremos a las células que reciben pAVB3 como $\Delta crtE$ y a las que reciben pAVB14 como $\Delta crtE \Delta crtY$.

Cuando la estirpe de *E. coli* sin el gen que codifica para la GGPPS ($\Delta crtE$) se transformó con el gen *crtE* se observó la acumulación de β -caroteno ($113,33 \pm 17 \mu\text{g/g}$ peso seco), mientras que este pigmento no fue detectado en células transformadas con pUC19 (Figura 10) (Tabla 3.4 y 3.5). Cuando la estirpe $\Delta crtE$ se transformó con el plásmido con el ADNc de *carC* se detectó la acumulación de β -caroteno ($28,45 \pm 6 \mu\text{g/g}$

peso seco)(Figura 3.9) (Tabla 4 y 5). Estos resultados confirman que *carC* codifica para una GGPPS capaz de complementar la falta de *crtE* en *E. coli*. Además, cuando la cepa $\Delta crtE$ fue transformada con plásmidos con los ADNc de los genes *carC* y *carRA* de *Phycomyces* también se detectó la acumulación de β -caroteno en la bacteria en mayor cantidad que cuando no contenían el plásmido con el ADNc de *carRA* ($36,68 \pm 11 \mu\text{g/g}$ peso seco) (Tabla 3.4 y 3.5).

Cuando la estirpe de *E. coli* sin la GGPPS y la licopeno ciclasa ($\Delta crtE \Delta crtY$) fue transformada con el plásmido pUC19 no se detectó la acumulación de ningún caroteno. Sin embargo, cuando esta estirpe se transformó con el plásmido con el ADNc del gen *carC* se obtuvo licopeno ($73,50 \pm 17 \mu\text{g/g}$ peso seco de licopeno). Similares resultados se obtuvieron cuando se cotransformó con plásmidos con el ADNc de *carC* y *carRA* de *Phycomyces* ($36,83 \pm 8 \mu\text{g/g}$ peso seco). Este resultado sugiere que la actividad licopeno ciclasa de CarRA no funciona en *E. coli* (Figura 3.10 y 3.11) (Tabla 3.4 y 3.5).

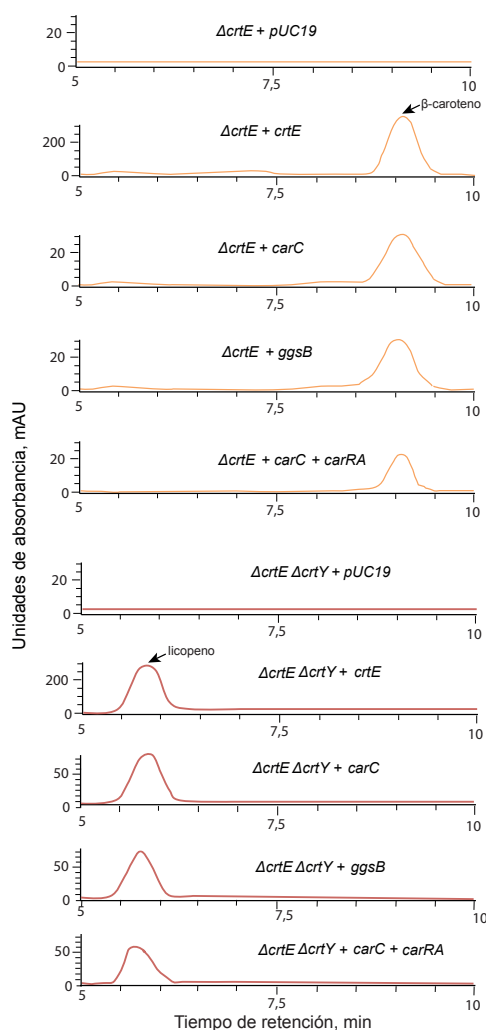


Figura 3.11: Cromatograma de los perfiles de elución del HPLC obtenidos con extractos de las cepas de *E. coli* transformadas con los plásmidos que contienen los genes *crt* de *E. uredoovora* o los genes *carC* y *ggsB* de *P. blakesleeanus*. Se indican con una flecha los carotenos detectados a 450 nm (β -caroteno) y a 475nm (licopeno). Las estirpes de *E. coli* han sido transformadas con un plásmido que contiene los genes necesarios para sintetizar β -caroteno de *E. uredoovora* excepto *crtE* ($\Delta crtE$) ó *crtE* y *crtY* ($\Delta crtE \Delta crtY$), y además con el gen *crtE*, *carC*, *ggsB* o *carRA*. En la figura sólo se indican los genotipos relevantes de cada estirpe y cada plásmido. Las gráficas de color naranja indican la presencia de β -caroteno y las gráficas de color rojo indican la presencia de licopeno.

Hemos realizado experimentos similares para confirmar la actividad GGPPS de GgsB en *E. coli*. Cuando la estirpe sin el gen que codifica para la GGPP sintasa ($\Delta crtE$) fue transformada con el ADNc de *ggsB* se observó la acumulación de β -caroteno ($6,17 \pm 3 \mu\text{g/g}$ peso seco de β -caroteno) mientras que no se detectó la acumulación de ningún pigmento en la estirpe transformada con pUC19. Por lo tanto, el gen *ggsB* también codifica para una enzima con actividad GGPPS capaz de complementar la falta de CrtE de *E. uredovora* en *E. coli*. La actividad de GgsB es menor que la de CarC ya que se produjo una menor acumulación de β -caroteno que cuando *E. coli* fue transformada con CarC. Cuando la estirpe $\Delta crtE \Delta crtY$ se transformó con el gen *ggsB* de *Phycomyces* se observó la acumulación de licopeno ($37,1 \pm 8 \mu\text{g/g}$ peso seco de licopeno) de la misma forma que al transformar con el gen *carC* (Figura 3.11 y 3.12) (Tabla 3.4 y 3.5).

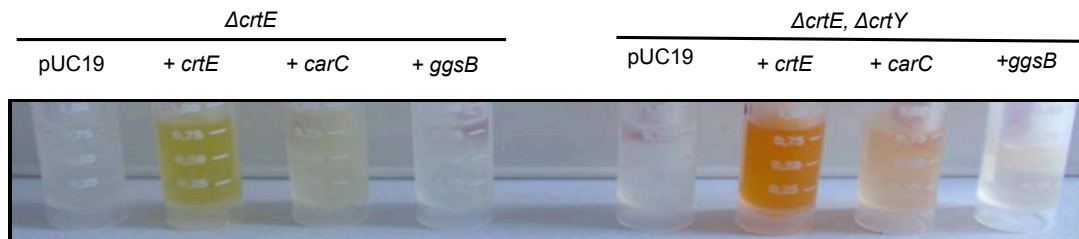


Figura 3.12: Extractos carotenogénicos procedentes de las distintas cotransformaciones realizadas entre los genes *crt* de *E. uredovora* y los genes *carC* y *carRA* de *P. blakesleeanus*. $\Delta crtE$: control negativo; + *crtE*: control positivo. Imagen cortesía de la Dra. Catalina Sanz.

Los resultados muestran que CarC y GgsB codifican para GGPPS ya que son capaces de complementar la falta de la GGPPS CrtE en *E. coli* para sintetizar β -caroteno.

Tabla 3.4: *E. coli* DH5 α se transformó con un plásmido con los genes de *E. uredovora* para sintetizar β -caroteno excepto *crtE* o *crtY*, además, un plásmido con el gen *crtE* o el ADNc de *carC*, *carRA* o *ggsB*.

Plásmidos Clr ^R	Plásmidos Amp ^R y Tet ^R	Carotenos		
		Licopeno	γ -caroteno	β -caroteno
pAVB3 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , <i>crtY</i> , Δ <i>crtE</i>)	+ pUC19			
pAVB3 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , <i>crtY</i> , Δ <i>crtE</i>)	+ pAVB8 (<i>crtE</i>)		✓	✓
pAVB3 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , <i>crtY</i> , Δ <i>crtE</i>)	+ pGEMT (<i>carC</i>)			✓
pAVB3 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , <i>crtY</i> , Δ <i>crtE</i>)	+ pGEMT (<i>carC</i>)			✓
pAVB3 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , <i>crtY</i> , Δ <i>crtE</i>)	+ pCS19 (<i>carRA</i>)			✓
pAVB3 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , <i>crtY</i> , Δ <i>crtE</i>)	+ pGEMT (<i>ggsB</i>)			✓
pAVB14 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , Δ <i>crtE</i> , Δ <i>crtY</i>)	+ pUC19			
pAVB14 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , Δ <i>crtE</i> , Δ <i>crtY</i>)	+ pAVB8 (<i>crtE</i>)	✓		
pAVB14 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , Δ <i>crtE</i> , Δ <i>crtY</i>)	+ pGEMT (<i>carC</i>)	✓		
pAVB14 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , Δ <i>crtE</i> , Δ <i>crtY</i>)	+ pGEMT (<i>carC</i>)	✓		
pAVB14 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , Δ <i>crtE</i> , Δ <i>crtY</i>)	+ pCS19 (<i>carRA</i>)	✓		
pAVB14 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , Δ <i>crtE</i> , Δ <i>crtY</i>)	+ pGEMT (<i>ggsB</i>)	✓		

La tabla muestra la acumulación de carotenos: β -caroteno, γ -caroteno o licopeno en las cepas resultantes de los experimentos de cotransformación. Los genes deletados son mostrados con el símbolo Δ . El símbolo (✓) indica presencia de los correspondientes carotenoides en las muestras de las distintas cotransformaciones realizadas y cuyos extractos fueron analizados mediante HPLC. Clr^R: plásmido resistente a cloranfenicol; Amp^R: plásmido resistente a ampicilina; Tet^R: plásmido resistente a tetraciclina. Los plásmido pAVB fueron cedidos por el Dr. Antonio Velayos Baeza, y los plásmidos pCS fue construido en por la Dra. Catalina Sanz (Sanz et al., 2011b).

Tabla 3.5: *E. coli* DH5 α se transformó con un plásmido con los genes de *E. uredovora* para sintetizar β -caroteno excepto *crtE* o *crtY*, además, un plásmido con el gen *crtE* o el ADNc de *carC*, *carRA* o *ggsB*.

Plásmido Clr ^R	Plásmidos Amp ^R y Tet ^R	Carotenoides (μ g/g peso seco)	
		Licopeno	β -caroteno
pAVB3 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , <i>crtY</i> , Δ <i>crtE</i>)	+ pUC19		-
pAVB3 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , <i>crtY</i> , Δ <i>crtE</i>)	+ pAVB8 (<i>crtE</i>)		113,33 \pm 17
pAVB3 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , <i>crtY</i> , Δ <i>crtE</i>)	+ pGEMT (<i>carC</i>)		28,45 \pm 6
pAVB3 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , <i>crtY</i> , Δ <i>crtE</i>)	+ pGEMT (<i>carC</i>)		36,68 \pm 11
pAVB3 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , <i>crtY</i> , Δ <i>crtE</i>)	+ pCS19 (<i>carRA</i>)		
pAVB3 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , <i>crtY</i> , Δ <i>crtE</i>)	+ pGEMT (<i>ggsB</i>)		6,17 \pm 3
pAVB14 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , Δ <i>crtE</i> , Δ <i>crtY</i>)	+ pUC19	-	
pAVB14 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , Δ <i>crtE</i> , Δ <i>crtY</i>)	+ pAVB8 (<i>crtE</i>)	119,07 \pm 15	
pAVB14 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , Δ <i>crtE</i> , Δ <i>crtY</i>)	+ pGEMT (<i>carC</i>)	73,50 \pm 17	
pAVB14 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , Δ <i>crtE</i> , Δ <i>crtY</i>)	+ pGEMT (<i>carC</i>)	36,83 \pm 8	
pAVB14 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , Δ <i>crtE</i> , Δ <i>crtY</i>)	+ pCS19 (<i>carRA</i>)		
pAVB14 (<i>crtB</i> , <i>crtl</i> , Δ <i>crtE</i> , Δ <i>crtY</i>)	+pGEMT (<i>ggsB</i>)	37,1 \pm 8	

La tabla muestra la acumulación de carotenos: β -caroteno, γ -caroteno o licopeno en las cepas resultantes de los experimentos de cotransformación. Los genes deletados son mostrados con el símbolo Δ . La tabla muestra la cuantificación de carotenoides de las diferentes cotransformaciones realizadas en *E. coli* para comprobar la actividad GGPPS del gen *carC* de *P. blakesleeanus*. Clr^R: plásmido resistente a cloranfenicol; Amp^R: plásmido resistente a ampicilina; Tet^R: plásmido resistente a tetraciclina. Los plásmido pAVB fueron cedidos por el Dr. Antonio Velayos Baeza, y los plásmidos pCS fueron construidos por la Dra. Catalina Sanz (Sanz et al., 2011b).

3.2.3 Complementación del gen *carC* de *Phycomyces blakesleeanus* en *Neurospora crassa*.

Neurospora crassa contiene en su genoma el gen *al-3* con una identidad del 56% con el gen *carC* de *P. blakesleeanus*. El gen *al-3* es esencial pero el mutante *al-3* tiene una mutación puntual que da lugar a un cambio de la serina 335 a asparragina (Carattoli et al., 1991; Romano & Macino, 1991). Esta mutación está localizada aguas abajo del dominio V típico de las GGPPS y es responsable de la reducida actividad GGPPS observada en el mutante (Sandmann et al., 1993). Para investigar si el gen *carC* puede complementar la función del gen *al-3* de *N. crassa*, se transformó la estirpe NCS1 (*al-3 his-3*) con un plásmido con el ADNc del gen *carC* de *P. blakesleeanus*.

La estirpe NCS1 se consiguió mediante un cruzamiento entre las estirpes FGSC#6524 (*his-3*, a) y FGSC#2082 (*al-3*, A). Para la transformación se utilizó el plásmido pMF272 (Freitag et al., 2004) en el que se clonó el ADNc del gen *carC* de *P. blakesleeanus*. El plásmido pMF272 está diseñado para insertar el gen de interés (*carC*) mediante recombinación en el gen *his-3* de *N. crassa* (Margolin et al., 1997). Este plásmido tiene el gen *his-3* truncado ya que carece de los 567 nucleótidos (189 aminoácidos) primeros del gen, y también tiene la región 3' UTR de dicho gen. Además, entre estas regiones se encuentra el ADNc del gen *carC* bajo la regulación del promotor fotoinducible *ccg-1* (McNally & Free, 1988) (Figura 13). Cuando se transforma la estirpe NCS1 con el plásmido, estas regiones recombinan con el gen *his-3* lo que da lugar a la reconstrucción del gen *his-3* silvestre y la integración del resto del plásmido con el ADNc del gen *carC* (Figura 3.13).

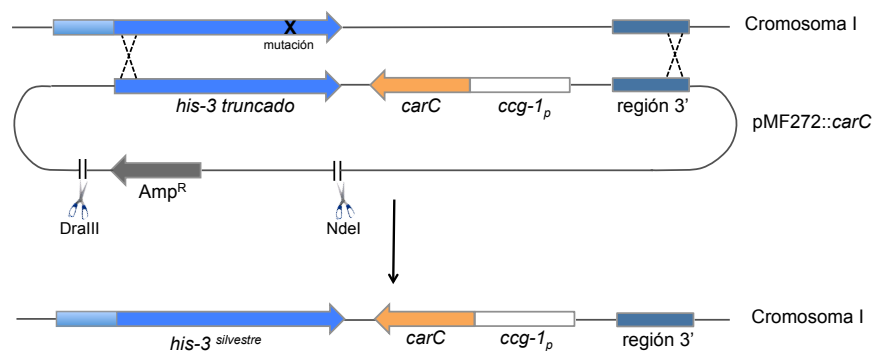


Figura 3.13: Esquema de la integración del gen *carC* de *P. blakesleeanus* mediante el reemplazamiento del gen *his-3* de *N. crassa*. Para ello se ha utilizado el plásmido pMF272 que carece de los primeros 189 aminoácidos del gen *his-3* de *N. crassa* aunque también tiene dos regiones homólogas presentes en el ADN genómico de *N. crassa* a través de las cuales se consigue la integración y reemplazamiento del gen *his-3* además del gen de interés (*carC*). El gen *carC* se encuentra bajo el promotor fotoinducible *ccg-1*. El plásmido es linealizado con las enzimas de restricción NdeI y DraIII para su correcta integración en el genoma de *N. crassa*.

El plásmido pMF272::*carC* se comprobó mediante digestión y PCR con cebadores específicos para *carC* (Figura 3.14).

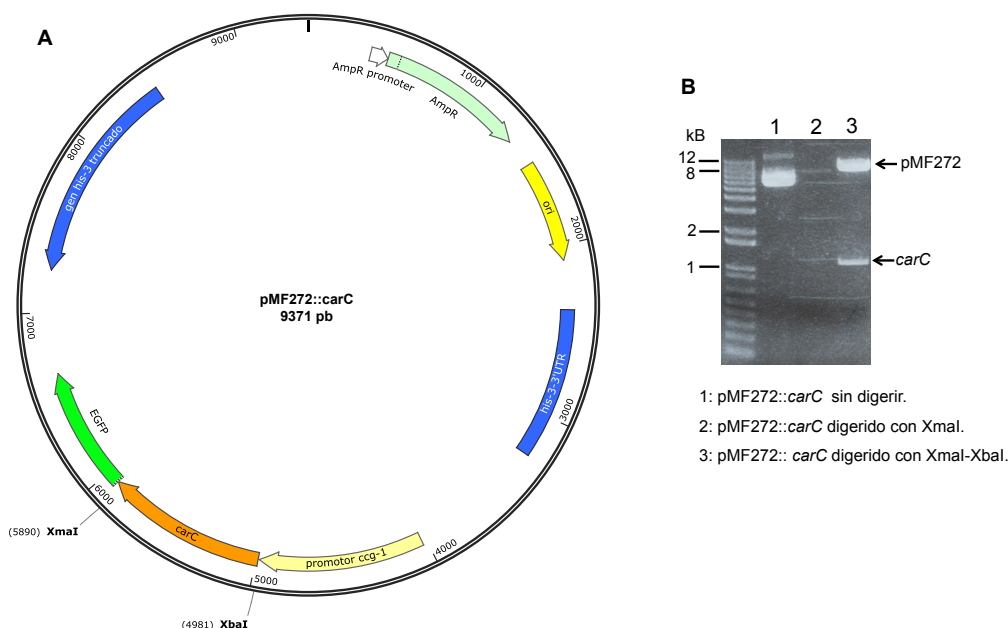


Figura 3.14: A: Esquema del plásmido pMF272 con el ADNc del gen *carC* de *P. blakesleeanus*. B: Comprobación de la clonación del gen *carC* en el plásmido pMF272 mediante digestión con las enzimas de restricción XbaI-XmaI. En el carril 3 de la electroforesis se observa tras la digestión una banda de 8.4 kb que corresponde con el plásmido pMF272 y otra de 0,9 kb que corresponde al ADNc del gen *carC* de *P. blakesleeanus*.

Posteriormente, se procedió a la transformación mediante electroporación de los conidios de la estirpe NCS1 de *N. crassa*. Se obtuvieron dos transformantes de color blanco como la estirpe NCS1 original (Figura 3.15). Los transformantes obtenidos se aislaron desde la placa de transformación a tubos de Vogel inclinados sin histidina y los conidios se inocularon en placas de FGS. Las placas FGS permiten el crecimiento colonial sin histidina y fueron utilizadas para seleccionar una colonia e inocularla de nuevo en tubos de medio Vogel inclinado sin histidina. Este proceso se hizo tres veces con el fin de purificar una colonia homocariote con todos los núcleos con el ADNc del gen *carC* de *P. blakesleeanus*.



Figura 3.15: Fenotipo de los transformantes obtenidos tras la transformación de la estirpe NCS1 de *N. crassa* con el plásmido pMF272::*carC*. wt: estirpe silvestre, NCS1 (*al-3 his-3*), T1 y T2: transformantes. El micelio fue crecido en medio Vogel sólido durante dos días a 34°C y posteriormente expuestos a la luz. Se muestra como los transformantes con el gen *carC* de *P. blakesleeanus* no complementan la mutación del gen *al-3* de *N. crassa* y dan lugar a micelio de color blanco.

Para confirmar que el ADNc de *carC* estaba presente en el genoma de los transformantes se amplificó el ADNc de dicho gen por PCR en la estirpe silvestre (FGSC#2489), la estirpe NCS1 y los transformantes de *N. crassa* (T1 y T2). Como cabía esperar únicamente el genoma de los transformantes contenían el gen *carC* de *P. blakesleeanus* (Figura 3.16).

Para comprobar que el gen *carC* de *Phycomyces* se ha insertado al lado del gen *his-3* se realizaron PCRs en la estirpe silvestre, la estirpe NCS1 y las estirpes transformantes (T1 y T2) utilizando un cebador que se une dentro del gen *carC* y otro cebador que se une dentro del gen *his-3*. Los resultados muestran que el gen *carC* está localizado al lado del gen *his-3* restaurado en las estirpes transformantes (Figura 3.16).

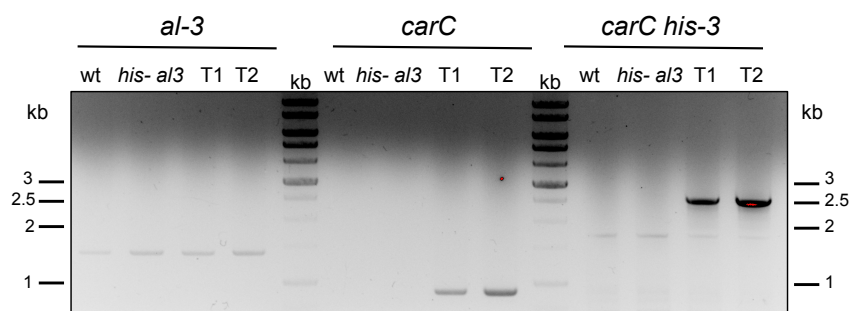


Figura 3.16: Comprobación de la transformación del ADNc del gen *carC* de *Phycomyces* en *N. crassa*. La figura muestra los resultados de amplificar el gen *al-3*, *carC* y la región de ADN entre *carC* e *his-3* en la estirpe silvestre, NCS1 y los dos transformantes.

3.2.3.1 Análisis de los transformantes.

El fenotipo albino de los transformantes sugiere que el ADNc del gen *carC* no complementa la mutación *al-3*. Sin embargo, otra hipótesis podría ser que el gen *carC* no se transcribiese con normalidad bajo el promotor *cgc-1*. Para investigar si *carC* se transcribía en las estirpes transformadas se realizó una RT-PCR cuantitativa en la estirpe

silvestre, la estirpe transformada NCS1, y de los dos transformantes. Estas estirpes fueron cultivadas tanto en luz como en oscuridad ya que el gen *carC* está insertado en el genoma bajo un promotor fotoinducible (Figura 3.17).

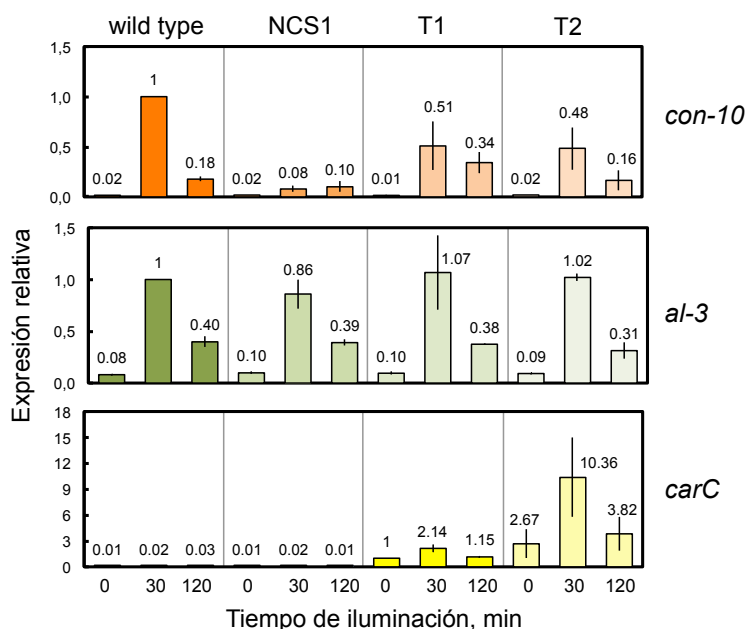


Figura 3.17: Acumulación de ARNm después de iluminar a diferentes tiempos de luz la estirpe silvestre, NCS1, T1 y T2 de *N. crassa*. Los micelios fueron crecidos en Vogel mínimo durante 24 horas a 34°C en oscuridad y expuestos a diferentes tiempos de luz. Estos resultados de cada PCR para cada gen fueron normalizados a la correspondiente PCR de gen *tub-2* como control de carga y normalizados a los valores obtenidos a los 30 minutos de iluminación de la estirpe silvestre. El gen *con-10* se utilizó como control positivo de la fotoinducción. Las gráficas muestran la expresión relativa de dos experimentos independientes y sus correspondientes errores estándar.

Los resultados obtenidos en la RT-PCR cuantitativa muestran la acumulación de ARNm del gen *con-10* y *al-3* en todas las estirpes, incluida el mutante *al-3*, así como la acumulación de ARNm de *carC* en los transformantes debido a que son los únicos que tienen este gen (Figura 3.17). Los resultados muestran una acumulación de ARNm de *carC* tras 30 minutos de iluminación, ya que *cgc-1* es un promotor fotoinducible (Arpaia et al., 1995). Tanto *con-10* como *al-3* son genes cuya transcripción está regulada por la luz y se observa una acumulación de sus ARNm tras 30 minutos de exposición a la luz. Exposiciones más prolongadas (120 minutos) disminuyen la respuesta transcripcional debido al fenómeno de la fotoadaptación (Malzahn et al., 2010). Estos resultados indican que la falta de complementación por el ADNc de *carC* no se debe a la falta de transcripción de dicho gen en *N. crassa*.

Para confirmar que los transformantes no acumulaban ningún caroteno aunque tuvieran el gen *carC* de *P. blakesleeanus* se procedió a la extracción de carotenos de la estirpe silvestre, la estirpe NCS1, y los dos transformantes de micelios mantenidos en oscuridad o expuestos a la luz durante 8 minutos. Una vez extraídos los carotenos, se cuantificaron mediante espectrofotometría (Figura 3.18).

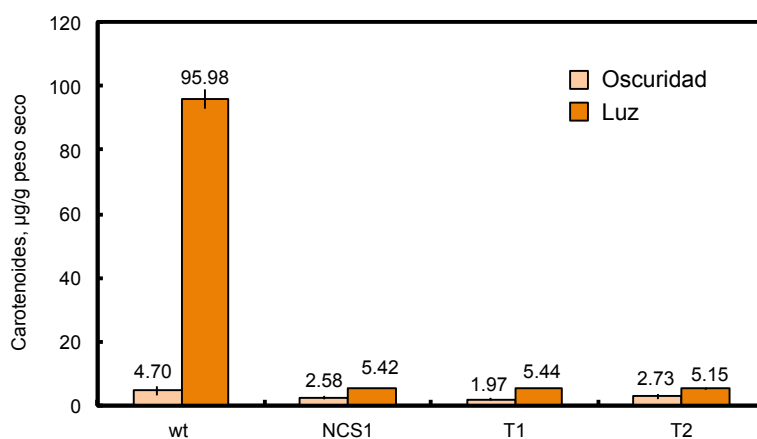


Figura 3.18: Producción de carotenos en los transformantes obtenidos de *N. crassa*. Los carotenos fueron extraídos de micelios crecidos en oscuridad continua durante 48 horas o expuestos 8 minutos a luz blanca y posteriormente crecidos de nuevo en oscuridad. Las estirpes utilizadas fueron la estirpe silvestre (wt); la estirpe NCS1 (*al-3 bis-3*), y los transformantes (T1 y T2) obtenidos en la transformación con el plásmido pMF272 y el gen *carC* de *P. blakesleeanus*. Los datos de la cantidad media de carotenoides fueron obtenidos en tres experimentos independientes; indicando el error estándar de los tres experimentos.

Como se observa en la figura 3.18, los transformantes con el ADNc del gen *carC* de *Phycomyces* no complementan la mutación del gen *al-3* en *Neurospora*, ya que producen la misma cantidad de carotenos que la estirpe transformada NCS1. Estos resultados indican que la homología entre *al-3* y *carC* no es suficiente para complementar la falta de GGPPS en *N. crassa*.

El hecho de que los transformantes tengan un micelio de color blanco aunque tengan en su genoma el gen *carC* de *P. blakesleeanus* y que se exprese en los transformantes indica que *carC* no complementa la mutación del gen *al-3* de *N. crassa*.

3.3 Discusión

La biosíntesis del β -caroteno comienza con la condensación del farnesil pirofosfato (FPP) y el isopentenil pirofosfato (IPP) para dar geranilgeranil pirofosfato (GGPP) (Sagami et al., 1993). En *P. blakesleeanus* esta reacción la pueden llevar a cabo los genes *carC* y *ggsB* que codifican para la geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS). Resultados previos en nuestro laboratorio permitieron proponer la hipótesis de que los mutantes *carC* que acumulan menos β -caroteno tienen mutaciones en el gen *ggsA*. Nuestros resultados combinando un análisis de recombinación y la expresión heteróloga en *E. coli* permiten confirmar que *ggsA* es *carC*.

Phycomyces blakesleeanus produce trisporoides que derivan de la rotura de la molécula de β -caroteno y son usados por el hongo como feromonas durante la interacción sexual para el reconocimiento entre ambas estirpes de sexo contrario (Polaino et al., 2010; 2012; Schimek & Wöstemeyer, 2009). Los mutantes que carecen de β -caroteno son incapaces de estimular a la estirpe silvestre aunque ellos sí son estimulados por ella (Sutter, 1975a). En el caso de los mutantes *carC*, éstos presentan un micelio blanco aparentemente carente de β -caroteno pero cuando se analiza el contenido, se observa que todos estos mutantes producen aproximadamente unos 13 $\mu\text{g/g}$ peso seco de β -caroteno mientras que la estirpe silvestre en las mismas condiciones es capaz de producir 59 $\mu\text{g/g}$ peso seco (Revuelta & Eslava, 1983). Los mutantes *carC* que producen cuatro veces menos β -caroteno que la estirpe silvestre, son capaces de producir cigosporas viables tras la interacción sexual aunque hemos observado que estas cigosporas tardan más tiempo en germinar (aproximadamente 5-6 meses) que las cigosporas obtenidas de cruzamientos entre estirpes silvestres (2-3 meses). Por lo tanto, parece ser que el caroteno producido por estos mutantes *carC* es suficiente como precursores de las hormonas sexuales necesarias para estimular a la estirpe de sexo opuesto y producir cigosporas viables. Además, estos mutantes tienen un retraso en la maduración de los esporangios (Revuelta & Eslava, 1983).

Los resultados de muestran que *ggsB* se expresa preferentemente durante el ciclo sexual mientras que *carC* se expresa durante el crecimiento vegetativo tras la exposición a la luz (Tagua, 2012). En esta Tesis Doctoral hemos demostrado que las dos proteínas tienen una actividad GGPPS parecida, lo que sugiere que tras la duplicación génica se ha producido una especialización transcripcional para que cada enzima permita la síntesis de β -caroteno en diferentes etapas del ciclo de vida de *Phycomyces*.

Aunque hemos confirmado la identidad de *carC*, no se ha descrito ningún otro mutante blanco que tenga una mutación en *ggsB* (Tagua, 2012). Resulta interesante comprobar que aunque existan dos genes para GGPPS en *Phycomyces*, la mutación en *carC* da lugar a una disminución de la biosíntesis de β -caroteno que no puede ser corregida por la presencia de *ggsB*, aunque GgsB tenga actividad GGPPS. Dos posibilidades podrían explicarlo:

1. Las mutaciones en *carC* son rezumantes y permiten un poco de actividad GGPPS en el micelio vegetativo independientemente de la presencia de GgsB.

2. Que las mutaciones en *carC* den lugar a una GGPPS inactiva y que haya un poco de GgsB en micelios vegetativos que permita la biosíntesis parcial del β -caroteno y la síntesis de GGPP para otras funciones celulares. Esta hipótesis podría ser la más plausible. De hecho, todos los alelos *carC* acumulan la misma cantidad de β -caroteno, incluso la estirpe con el alelo *carC669* con una mutación que da lugar a una parada prematura y una proteína truncada de 35 aminoácidos. Es decir, independientemente del alelo de *carC*, todas las estirpes *carC* acumulan la misma cantidad de β -caroteno (Revuelta & Eslava, 1983). Es interesante que el alelo *carC669* no sea letal ya que la proteína CarC tiene sólo 35 aminoácidos lo que parece indicar que GgsB está complementando parcialmente su función.

Resulta interesante que CarC y GgsB funcionen en el sistema de expresión heteróloga en *E. coli* pero no en el hongo *N. crassa*. Es posible que las enzimas que participan en la biosíntesis de carotenoides de *N. crassa* formen un complejo enzimático parecido al de *Phycomyces* (Almeida & Cerdá-Olmedo, 2008; Sanz et al., 2002). Si esto es así, no es extraño que CarC no permita las interacciones moleculares para reconstituir el complejo carotenogénico de *N. crassa*, lo que impediría la complementación de la mutación *al-3* aunque hayamos detectado transcripción del gen en los transformantes de *N. crassa*. Además, puede que no se produzcan las modificaciones transcripcionales y traduccionales que permiten la actividad de estas enzimas.

La GGPPS de *Phycomyces* se purificó del mutante M1 (mutante *carS*) donde la actividad de la GGPPS es mayor. En dicha purificación aparecieron dos bandas, una de aproximadamente 30 kDa y otra de 60 kDa. Cuando la banda de 60 kDa fue separada por electroforesis de nuevo fueron encontradas otra vez las dos bandas anteriores, lo que permite proponer que la banda de 60 kDa se corresponde con un dímero (Brinkhaus & Rilling, 1988). Este dímero podría estar formado por dos monómeros de CarC, dos monómeros de GgsB o un monómero de CarC y otro de GgsB. Es probable que el dímero esté formado por dos subunidades de CarC por varios motivos: la GGPPS fue purificada de micelio vegetativo donde se expresa sobre todo *carC*. Además, la enzima purificada aparece como una banda de un peso molecular de unos 30 kDa y no como dos bandas como se esperaría si fuese un heterodímero ya que GgsB tiene un peso molecular algo mayor que CarC (36,73 y 34,06 kDa, respectivamente). Estos resultados no son incompatibles con la propuesta de que GgsB esté complementando en parte la función de

CarC ya que aunque el gen se reprima en micelio vegetativo expuestos a la luz, es posible que exista suficiente GgsB para permitir la síntesis de GGPP y la complementación parcial de los mutantes *carC*. En definitiva, nuestros resultados muestran que las mutaciones en el gen *ggsA* están ligadas al fenotipo de los mutantes *carC*, confirman que *ggsA* es *carC* y que *carC* y *ggsB* codifican para proteínas con actividad GGPPS.

DISCUSIÓN GENERAL

Phycomyces blakesleeanus ha sido utilizado como organismo modelo para investigar respuestas del hongo al ambiente que le rodea. Uno de los estímulos más estudiados es el efecto de la luz en el comportamiento de este hongo (Corrochano, 2007; Idnurm et al., 2010). La luz azul regula varios aspectos de la biología de este hongo: el desarrollo de los cuerpos fructíferos (esporangióforos), estimula la biosíntesis de carotenos, y modifica la dirección (fototropismo) y velocidad de crecimiento de los esporangióforos (Cerdá-Olmedo, 2001; Sanz et al., 2009). Todas las respuestas a la luz en *Phycomyces* están controladas por el complejo Mad, formado por las proteínas MadA y MadB homólogas a WC-1 y WC-2 de *Neurospora crassa*, respectivamente. De la acción de este complejo depende la fotoinducción de muchos genes en el hongo (Sanz et al., 2009) y, recientemente se ha confirmado los mecanismos moleculares de la inhibición del sexo en *Phycomyces* por la luz debido al complejo Mad (Shakya & Idnurm, 2017). Las fotorrespuestas en *Phycomyces* se presentan de forma escalonada con dos componentes cuyos umbrales son aproximadamente 10^{-4} y 1 J/m^2 de luz azul y sugiere la existencia de dos sistemas de fotorrecepción, uno optimizado para baja intensidad y otro para alta intensidad de luz (Corrochano & Cerdá-Olmedo, 1990a). Este intervalo tan amplio de sensibilidad a la luz ocurre a través de la fotoactivación génica por parte del complejo Mad, lo que sugiere que en la recepción de la luz en este hongo puedan participar otras proteínas receptoras, como WcoA o WcoB.

En el caso de WcoB hemos comprobado que se traduce levemente en luz con respecto a oscuridad. Este hecho puede ser debido a que esta proteína se active cuando el hongo esté sometido a altas intensidades de luz y no necesite un gran aumento en la cantidad de proteína para modular la respuesta a dicho estímulo. Además, WcoB carece del dominio dedo de zinc característico de las proteínas del tipo WC-1 de *N. crassa*, sugiriendo que no interacciona directamente con el ADN para la transcripción génica (Sanz et al., 2009). Partiendo de este hecho y de que la proteína MCWC-1b de *Mucor*, homóloga a WcoB, participa en la carotenogénesis de dicho hongo (Silva et al., 2008), realizamos experimentos de inmunoprecipitación para conocer cuál podría ser el papel de esta proteína para *Phycomyces*. Estos resultados certificaron que WcoB interacciona con proteínas de la ruta de la biosíntesis de carotenos como CarRA, CarB o CarS entre otras, y proteínas del tipo WC. La proteína CarS apareció en todas la inmunoprecipitaciones realizadas y esta proteína tiene un dominio oxigenasa de

caroteno que se encarga de cortar el β -caroteno. La interacción WcoB-CarS se confirmó además mediante la técnica BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) utilizando *Aspergillus nidulans* como modelo.

De todas las proteínas carotenogénicas que interaccionan con WcoB la proteína CarS parece tener una señal mayor en la inmunoprecipitación. Cuando comprobamos la cantidad de WcoB en el mutante *carS* (estirpe S324) que carece prácticamente del dominio oxigenasa la acumulación de WcoB en dicho mutante es significativamente menor que en la estirpe silvestre aún existiendo transcripción del gen. Una hipótesis que podría explicar este resultado sería que al no estar la mayor parte de la proteína CarS, la estabilidad de WcoB puede verse afectada y estar más accesible para las proteasas o disponible para sufrir modificaciones postraduccionales.

La regulación de WcoB en *Phycomyces* parece ser a través de la ubiquitinación de dicha proteína como ocurre con la proteína MCWC-1b de *Mucor* (Silva et al., 2008). En *Mucor* la proteína MCWC-1b es ubiquitinada por CrgA e inactiva la biosíntesis de carotenos (Silva et al., 2008). WcoB también es ubiquitinada aunque en este caso no podemos confirmar que sea a través de CrgA ni que ocurre la disminución de carotenos debido a que no existe un mutante del gen *wcoB*. Nuestros resultados indican que WcoB está interaccionando con el complejo carotenogénico y nos sugiere por su homología a la proteína MCWC-1b de *Mucor*, que está promoviendo la carotenogénesis a altas intensidades de luz. Cuando hay suficiente β -caroteno, WcoB es ubiquitinada e inactivada para cesar la producción de β -caroteno.

La interacción con proteínas de tipo WC sugiere la formación de diferentes complejos WC en *Phycomyces* nucleares o citoplásmicos. Las interacciones detectadas ocurren en el citoplasma y es posible que se formen complejos entre WcoB y otras proteínas WC para la regulación por luz de procesos biológicos, o que exista una pequeña cantidad localizada en el núcleo, que no sea detectada en nuestros experimentos, y que interaccione con MadB para regular la transcripción de genes fotoinducibles. Este hecho ya se ha observado en basidiomicetos donde la proteína del tipo WC-1 no tiene dominio dedo de zinc y utiliza el que aparece en la proteína de tipo WC-2 (Idnurm & Heitman, 2005).

Con el fin de profundizar en la fotobiología de *Phycomyces* hemos identificado el gen *madC* que codifica para una proteínas GTPasa activadora de Ras, siendo la primera proteína que participa en la cadena de transducción sensorial para el fototropismo después del fotorreceptor. El gen *madC* no se induce por la luz, aunque su transcripción aumenta cuando el complejo Mad está mutado. La interacción entre MadC y el complejo Mad no ha sido confirmado, pero debe existir una relación entre ambos ya que parece que la transcripción de *madC* está levemente reprimida por el complejo Mad. Nuestra hipótesis consistiría en que en luz, RasGDP pasa a RasGTP e induce una ruta de señalización que hace que una proteína inhibidora no esté activa completamente y permite parcialmente la acción de las sintetasas de quitina o proteínas de la pared celular para que el esporangióforo gire hacia la fuente de luz. Cuando *madC* está mutado y la proteína no funciona correctamente, la ruta de señalización está permanentemente activa y por tanto, esto conlleva a que la proteína inhibidora está ejerciendo completamente su función inhibiendo totalmente las sintetasas de quitina y por consiguiente, el esporangióforo no crece hacia la luz. Suponemos que la identificación de proteínas que interaccionan con Ras puedan ayudar a completar la cadena de transducción sensorial para el fototropismo de *Phycomyces*.

Existen ejemplos de otras proteínas homólogas a MadC en otros hongos que participan en procesos celulares como la proteína IRA-1 de *N. crassa*. Se ha comprobado que la delección de *ira-1* provoca una alteración del ritmo circadiano (Polaino et al., 2017) y a una menor sensibilidad a la luz (Luque, E, com. pers.). IRA-1 debe interaccionar con Ras para regular su actividad, y su acumulación en conidios indica un papel importante en la germinación y el crecimiento de la hifa, seguramente para participar en el ritmo circadiano a través de Ras.

Una de las rutas metabólicas reguladas por la luz es la biosíntesis de carotenos en *Phycomyces*. Los resultados obtenidos en esta tesis han permitido conocer la actividad de los genes *carC* y *ggsB* de este hongo. Resultados previos en nuestro laboratorio permitieron proponer que los mutantes *carC* que acumulan menos caroteno tienen mutaciones en el gen *ggsA* de *Phycomyces* (Tagua, 2012). Nuestros resultados combinando un análisis de recombinación y la expresión heteróloga en *E. coli* han permitido confirmar que *ggsA* es *carC*. Además hemos confirmado que *carC* y *ggsB* tienen actividad GGPPS.

El hecho de que existan dos genes en *Phycomyces* que codifiquen para una GGPPS y que *ggsB* no supla la falta de *carC* podría ser debido a que las mutaciones *carC* son rezumantes o que GgsB permita la biosíntesis parcial de caroteno suficiente para la síntesis de GGPP para otras funciones celulares. Esta parece la hipótesis más plausible ya que todos los alelos *carC* producen la misma cantidad de β -caroteno independientemente de la mutación que tengan (Revuelta & Eslava, 1983). Nuestros resultados no son incompatibles con la propuesta de que GgsB esté complementando en parte la función de CarC ya que aunque el gen se reprima en micelio vegetativo expuestos a la luz, es posible que exista suficiente GgsB para permitir la síntesis de GGPP y la complementación parcial de los mutantes *carC*.

CONCLUSIONES

1. WcoB es una proteína citoplasmática y se acumula levemente en micelios iluminados. WcoB interacciona con proteínas para la biosíntesis de β -caroteno y proteínas WC.
2. WcoB y CarS interaccionan en *Phycomyces* y en *Aspergillus*. Esta interacción se produce en el citoplasma.
3. CarS regula la acumulación de WcoB. En el mutante *carS* (alelo *carS180*), que carece del dominio oxigenasa, disminuye drásticamente la acumulación de WcoB.
4. WcoB se ubiquitina y esta modificación puede regular su actividad o su estabilidad.
5. El gen *madC* de *P. blakesleeanus* codifica para una proteína GTPasa activadora de Ras (RasGAP) y es la primera proteína identificada que participa en la cadena de transducción sensorial para el fototropismo después del fotorreceptor.
6. El gen *madC* no se fotoinduce ni en la estirpe silvestre ni en los mutantes con los diferentes alelos de *madC*.
7. El gen homólogo de *madC* en *Neurospora*, *ira-1* (NCU06122), no se induce por luz ni se observan cambios en la acumulación de la proteína.
8. IRA-1 es citoplasmática y se acumula en conidios y en micelio vegetativo a las 15 horas de la inducción al desarrollo.
9. Las mutaciones en el gen *ggsA* de *P. blakesleeanus* están ligadas al fenotipo de los mutantes *carC*.
10. Los genes *carC* y *ggsB* codifican para proteínas con actividad GGPPS.
11. Los genes *carC* y *ggsB* expresados en *E. coli* complementan la mutación del gen que codifica para la GGPPS.
12. El gen *carC* expresado en *N. crassa* no complementa la mutación del gen *al-3* que codifica para la GGPPS de *Neurospora*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estirpes usadas en esta tesis:

-*Phycomyces blakesleeanus*.

Tabla MM1.1:

Estirpe ^a	Genotipo ^b	Fuente ^c
NRRL1555	Wild type (-)	
UBC21	Wild type (+)	
A56	Wild type (+)	A32 x NRRL1555
C47	<i>madA35</i> (-)	NRRL1555, NTG
C111	<i>madB103</i> (-)	NRRL1555, NTG
L51	<i>madA7 madB103</i> (-)	C303 x C21
A905	<i>madC406</i> (-)	NRRL1555, ICR-170
B2	<i>madC452</i> (-)	NRRL1555, ICR-170
A491	<i>madC491</i> (-)	NRRL1555, EMS
S5	<i>madC202, carA51</i> (-)	UBC24, NTG
C93	<i>madC84</i> (+)	NRRL1554, NTG
C2	<i>carA5</i> (-)	NRRL1555, NTG
C5	<i>carB10 geo10</i> (-)	NRRL1554, NTG
C9	<i>carR21</i> (-)	NRRL1554, NTG
A346	<i>carC662</i> (-)	NRRL1555, NQO
A355	<i>carC669</i> (-)	NRRL1555, NQO
A98	<i>carC652</i> (-)	NRRL1555, NQO
A344	<i>carC660 furA401</i> (-)	NRRL1555, NQO
M1	<i>carS43</i> (-)	NRRL1554, NTG
S324	<i>carS180</i> (-)	C2 x S213, NTG

^a La estirpe silvestre NRRL1555 fue obtenida en el Northern Regional Research Laboratory, USDA, Peoria, IL, U.S.A. Estirpes con prefijo C, proceden del laboratorio del Premio Nobel Max Delbrück (Instituto de Tecnología, California, Pasadena, CA, U.S.A.); A, proceden del laboratorio de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, España); S, proceden del Sevilla (Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, España); L, proceden de Siracusa (Departamento de Física, Universidad de Siracusa, U. S. A.); M, proceden de Morgantown (Universidad de Virginia, WV, U.S.A.); UBC, obtenida por R. J. Bandoni (Universidad de Columbia Británica, Vancouver, Canadá).

^b Mutaciones nombradas *mad* están afectadas en el fototropismo del esporangióforo; mutaciones *car* en carotenogénesis; mutaciones *geo* están afectadas en geotropismo; mutaciones *furA* muestran resistencia a 5-fluorouracilo.

^c Los mutantes fueron obtenidos mediante mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) o 4-nitroquinolina-1-óxido (NQO). Las estirpes con el símbolo "x" fueron obtenidas mediante cruzamiento sexual.

-*Neurospora crassa*:

Tabla MM1.2:

Estirpe	Genotipo	Fuente
FGSC#2489	74-OR23-1V <i>mat A</i>	FGSC
FGSC#6524	<i>his-3 mat a</i>	FGSC
FGSC#2082	<i>al-3 mat A</i>	FGSC
FGSC#10785	<i>ira-1, mat a</i>	FGSC
NCS1	<i>al-3 his-3</i>	Esta tesis
T1	<i>al-3 his-3 carC</i>	Esta tesis
T2	<i>al-3 his-3 carC</i>	Esta tesis
IRA-1::3xFLAG	<i>ira-1::10Xgly3XFLAG</i>	Esta tesis

-Aspergillus nidulans:

Tabla MM1.3:

Estirpe	Genotipo	Fuente
SVK103	<i>pyroA4; pyrG89; veA⁺</i>	Vienken & Fischer, 2006
ANS1	<i>pyroA4; pyrG89; veA⁺; madA::gfp</i>	Esta tesis
ANS2	<i>pyroA4; pyrG89; veA⁺; madB::gfp</i>	Esta tesis
ANS3	<i>pyroA4; pyrG89; veA⁺; wcoB::gfp</i>	Esta tesis
ANS4	<i>pyroA4; pyrG89; veA⁺; carS::gfp</i>	Esta tesis
ANB1	<i>pyroA4; pyrG89; veA⁺; wcoB::C-YFP; N-YFP</i>	Esta tesis
ANB2	<i>pyroA4; pyrG89; veA⁺; wcoB::C-YFP; carS::N-YFP</i>	Esta tesis

Para las clonaciones de plásmido se usó *Escherichia coli* DH5 α (*huA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*) (Taylor et al., 1993). Para el etiquetado de genes en *Neurospora* se utilizó para la construcción de cassette la levadura FY834 (*MAT α his3 Δ 200 ura3-52 leu2 Δ 1 lys2 Δ 202 trp1 Δ 63*).

2. Oligonucleótidos usados en esta tesis.

Tabla MM.2:

Nombre	Secuencia 5'→3'	Uso
wcoB-1325F	GCAACTTCCTTTTCGCTCAAGA	RT-PCR
wcoB-1395R	CATGGCTCCACTGTTCTGTTGT	RT-PCR
act-98F	AGGCTGTCCTTTCCCTTTACG	RT-PCR
act-165R	GACACCATCACCGGAATCG	RT-PCR
CRY-78F	GATCCACCCTGGAGATGTCAA	RT-PCR
CRY-147R	CCGTTTCCGAAAGGGTGTA	RT-PCR
carS-79F	CCTGCCTTCAACAAGCCAGTAG	RT-PCR
carS-144R	GACACCATTTACCACTCTGGAA	RT-PCR
crgA-58F	AACATTGGAGGCCTTCCCTAGA	RT-PCR
crgA-122R	CCTCGTCGTCGATATCCACAT	RT-PCR
madC-260-F	TGGCCCTTGACGAACAAAC	RT-PCR
madC-360-R	TCCGTATTGTTGCATTTTTCGA	RT-PCR
ncu06122RT44F	GGTATTCCATGTCGGCCTTGT	RT-PCR
ncu06122RT144R	GAGATCCCGCAGCACCTTT	RT-PCR
con10-45F	CAGCCACAGCGGAGGC	RT-PCR
con10-104R	TTGGAAGCAATTTCGCGC	RT-PCR
al3-165F	CATCTCTTCCGCCGGTCTAG	RT-PCR
al3-227R	ACCGAGGCCTTGCGTTTAC	RT-PCR
carC-F	AACGCAAACAAACACCCCTAA	RT-PCR
carC-R	TTGTGCTTTTTGGACACCTTTTC	RT-PCR
F-AscI-wcoB	GGCGCGCCAATGAATCCCTTTGAAAACATCGTCCCA TTTAACC	Etiquetado GFP,YFP

R-PacI-wcoB	TTAATTAATTACTACAAGCGCCGCATAGTACAAGTA TTGC	Etiquetado GFP,YFP
F-AscI-madA	GGCGCGCCAATGGATTCCCTTCTCATCTTAC	Etiquetado GFP,YFP
R-PacI-madA	TTAATTAATTATTATGTTTCCATTGCAGTGG	Etiquetado GFP,YFP
F-AscI-madB	GGCGCGCCAATGGAATCAGCTCGTCAACC	Etiquetado GFP
R-PacI-madB	TTAATTAATTATTATATGTCTGACCCATCTGG	Etiquetado GFP
F-AscI-carS	GGCGCGCCAATGCTTACTCCTGCCGCCG	Etiquetado GFP
R-PacI-carS	TTAATTAATTATTAGTTAACAGCAACACCTTTG	Etiquetado GFP
sexP-D3	GCAAAATGTGTACCGAAAGC	PCR
sexP-I3	ATTATTACAAAAGTCCTGCC	PCR
sexM-D3	CCTAGCATTCTATCAAGC	PCR
sexM-I3	GTAGTCTTGTGAGGTAGC	PCR
Oligo 2-F	TCTTATGCGAGATTCGGCAG	PCR
Oligo 2-R	TCACTGATACGACGGACTAG	PCR
Oligo 3-F	TACACGATCGAACAGCAAGC	PCR
Oligo 3-R	GAAGACAGTGATCTGATCCC	PCR
Oligo 4-F	GGTTTACTCGGGTCATTGAG	PCR
Oligo 4-R	TTCTGGCGCAATGGGTAATC	PCR
Oligo 5-F	CCAGTTTCGAGAGGATCTTC	PCR
Oligo 5-R	TCATGTGCAATTGCAGGTGG	PCR
ALID190-F	ACCAGCGCTGGACAACAC	PCR
ALID190-R	TATTCCGCAAACCTGATCC	PCR
Oligo 7-F	GGAATCGTATATGACGTGGC	PCR
Oligo 7-R	TCATTTATGCCACGCACAGC	PCR
Oligo 6D-F	GGCCTAAGACTTGCTACTC	PCR
Oligo 6D-R	GCCTACCAAGTCAAAGAAGC	PCR
Oligo 6B-F	GCCTTCCAGAGGTGATAGATAG	PCR
Oligo 6B-R	CAGAAGCAGGAGCATGACC	PCR
Oligo 6H-F	CGAGATCGATCTCGAAGATG	PCR
Oligo 6H-R	CGACTCTGTATCAGAGGTACG	PCR
ALID393-F	CCCATTCTTGTCCCTGTAG	PCR
ALID393-R	CATTACAAAATAGCACAGC	PCR
Oligo 21C-F	GACGTGTCTGTCATAGTGC	PCR
Oligo 21C-R	GAGCTTATACGAGATCCGAAG	PCR
Oligo 21I-F	CCTGTTGTAAGCCATGTTGCC	PCR
Oligo 21I-R	AGGCTGAGAAGAACCTCGAG	PCR
ALID1079-F	AATCCGTGAGATAAGCACAG	PCR
ALID1079-R	TAAGATGTACATCGTCCTAC	PCR
ALID1077-F	CTATTGTTATCATTCAAGGAGG	PCR
ALID1077-R	AATATCGCAGTTGCATTGAC	PCR
ALID1184-F	TCGTGCTACCGTACAAACCCCT	PCR
ALID1184-R	ACCCCGGTCTAATTGGGGTCTAGA	PCR
Oligo 54A-F	CTCTTCACAATGGCCATCCG	PCR
Oligo 54A-R	GCACTACCTCAGAGGGAAG	PCR
Oligo 54B2-F	CACGTGATCTACCGTTGTAAAG	PCR
Oligo 54B2-R	GGACCACTATTTCCATCCCAC	PCR
ALID1017-F	CTGGCTCGCTCAAGGTGAG	PCR
ALID1017-R	AACTCAAGATCGTTATGCTG	PCR
5'-6122-F	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACG GATTTATGCTCGAACTGTGCG	Etiquetado <i>ira-1</i>
5'-6122-R	CCTCCGCCTCCGCCCTCCGCCGCTCCGCC	Etiquetado <i>ira-1</i>

3'-6122-F	CCACCCCTTCTTCCGGGC TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCG ACACATCACTCAGTCTGACTTTAC	Etiquetado <i>ira-1</i>
3'-6122-R	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC CGGACCCGCCGAACCTTATTAG	Etiquetado <i>ira-1</i>
F-ATG-carC-XbaI	GACTTCTAGAATGACAGCCTCGAACGAGATCAA	PCR
R-carC669-Stop-XmaI	AGTCCCCGGGTTAAGAAGAATCTGTACAGATAGAT	PCR
R-carC662-XmaI	AGTCCCCGGGTTAATTGAAAAGCGATAACCCAG	PCR
R-carC668-XmaI	AGTCCCCGGGTTAATTACTCGATTTAATTTTGGGT	PCR
carC-F0	GAATGGCACTTTTGACTCCG	PCR
carC-F1	GCCGTTCGTTTAATGCAAGC	PCR
carC-R0	GATCTATTCATACACACCAAC	PCR
carC-F2	GGAATTCACCTTTCAAGTACG	PCR
carC-R2	CCAGGCTGAGACAAAAGATA	PCR
carC-R3	GTAAGATCTTCACAGAATCC	PCR
F-carC-XbaI	GACTTCTAGAATGACAGCCTCGAAC	Clonación pMF272
R-carC-STOP-XmaI	AGTCCCCGGGTTATTAATTGAAAAG	Clonación pMF272
F-NdeI-ATG-carC	CATATGATGACAGCCTCGAACGAGATC	Clonación pGEM
R-SmaI-stop-carC	CCCGGGTTAATTGAAAAGCGATAACCCAG	Clonación pGEM
F-NdeI-ATG-ggsB	CATATGATGCTTACTGTCCAATTTGATTC	Clonación pGEM
R-SmaI-Stop-ggsB	CCCGGGTTACTGCTCCTTGATGCTCAG	Clonación pGEM
al-3-F0-Neur.	GGTTAGCATCCTCTACAGTAC	PCR
al-3-R0-Neur.	CCAAAACATGAAACGGGTAC	PCR
al-3-F1-Neur	GGAAGACAACAGCGTCCTG	PCR
al-3-R1-Neur	GCGTAGAAATACACGTAGTTGG	PCR
his-3-R Neur.	CGATCTTGTCATGAACGCCG	PCR

3.- Medios y condiciones de cultivo.

3.1 Medios y condiciones de cultivo para *Phycomyces blakesleeanus*.

Phycomyces se cultivó en agar mínimo (Cerdá-Olmedo & Lipson, 1987a) que contenía 20 g/l de glucosa como fuente de carbono, 2 g/l de L-asparagina como fuente única de nitrógeno y adicional de carbono, 5 g/l de KH_2PO_4 , 0.5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 ml de una solución que provee al medio una concentración final de 2.8 g/l de CaCl_2 , y 10 ml de una solución que provee al medio 1 mg/l de tiamina; 2 mg/l de ácido cítrico; 1,5 mg/l de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 1 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,3 mg/l de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,05 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; y 0,05 mg/l de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Las soluciones concentradas se mantuvieron más de un año a temperatura ambiente en presencia de unas gotas de cloroformo. El pH del medio mínimo era 5.4 ± 0.1 . Para el medio nutritivo se añadió al medio mínimo 1 g/l de extracto de levadura. Para la obtención de colonias los medios se

acidificaron a pH 3.3 añadiendo ácido clorhídrico al medio autoclavado antes de dispensarlo en placas de Petri.

Para algunos cruzamientos entre estirpes de *Phycomyces* se utilizó agar papa. Para preparar 1 litro se utilizaron 200 g de papas frescas peladas y cortadas en dados que se hirvieron durante 1 hora y se filtró el líquido, al que se añadieron 20 g de glucosa, 15 g de agar y 2 mg de tiamina antes de autoclavar.

Para la recolección de esporas se inoculaban 10^5 esporas en medio mínimo sólido durante 36-72 horas. Los esporangios se recolectaron añadiendo 1 ml de agua destilada estéril en la tapa de la caja de Petri, volteando la base de la placa donde está el micelio sobre la tapa con el agua para poner en contacto los esporangios con el agua. A continuación se gira la parte superior con la inferior de la placa de Petri para facilitar la salida de las esporas. Estas esporas se recogen y se introducen en un tubo de 10 ml, se centrifugan a 4500 rpm durante 5 minutos, tirando el sobrenadante y resuspendiendo en 1 ml de agua destilada estéril. Este paso se repitió tres veces para limpiar e aislar las esporas correctamente. Las esporas se conservaron a -20°C en solución acuosa estéril de glicerol (200 ml/l).

3.2 Condiciones de cultivo.

Las esporas de *Phycomyces* se activaron durante 15 minutos a 48°C antes de inocularlas (Corrochano & Cerdá-Olmedo, 1988). En cada placa de Petri (8,5 cm de diámetro) con 25 ml de medio de cultivo se inocularon 10^5 esporas activadas. Las esporas se suspendieron en agar de cobertera (8 g/l agar) y posteriormente se dispensaba en placas con medio mínimo sólido. Para cultivos en medio líquido se inoculaban en medio mínimo 10^5 esporas en 250 ml de medio mínimo. Cultivos en medio líquido se usaron únicamente para experimentos de inmunoprecipitación de proteínas ya que se necesitaba gran cantidad de biomasa.

3.2.1 Condiciones de iluminación.

Los matraces para cultivos en medio líquido eran inoculados e incubados a 22°C durante 48 horas en oscuridad, y posteriormente se iluminaban 30 minutos con luz blanca (4 W/m^2) o se recogían en oscuridad sin iluminar. El cultivo se recogía con la ayuda de una bomba de vacío y un embudo para separar el medio de cultivo del micelio. Una vez recogidas todas las muestras se conservaban a -80°C para su posterior uso.

Para iluminaciones en medio sólido, se inoculaban las esporas una vez activadas y se incubaban durante 48 horas en oscuridad. Transcurrido este tiempo se iluminaba el micelio a distintos tiempos con luz azul ($1,3 \text{ W/m}^2$) o luz blanca (4 W/m^2) o se recogían sin iluminar. Una vez recogidos se conservaban a -80°C hasta su posterior uso. Los cultivos en medio sólido se utilizaban para extracción de ADN, ARN y proteínas.

La luz azul procede de una lámpara halógena de cuarzo instalada en un proyector lateral que pasa a través de dos filtros de calor y entre estos filtros de calor se coloca un filtro azul de banda ancha con transmisión máxima a 440nm. Las intensidades de luz se midieron con un fotodiodo calibrado (PIN-10DP / SB, United Detector Technology, Hawthorne, CA, EUA) acoplado con un amperímetro (modelo 485, Keithley Instrument, Cleveland, OH, EE.UU.). Para la incubación de los cultivos en luz blanca (4 W/m^2) se colocan bajo una batería de cinco lámparas fluorescentes (Philips TLD 36 W/54 CE) instaladas sobre una lámina de vidrio difusora. Las irradiaciones se realizaron en una sala de temperatura controlada que mantuvo constante la temperatura dentro de la cámara de iluminación y cerca de los 22°C .

3.2.3 Cruzamiento sexual.

Para los cruzamientos se inoculaban de manera enfrentada las dos estirpes a cruzar en agar papa. De cada estirpe se inoculaba 10^4 esporas previamente activadas. Una vez inoculadas las placas de agar papa se incubaban durante 48 horas en oscuridad a 22°C y transcurrido ese tiempo se incubaban en oscuridad a 16°C hasta la formación de las cigosporas. Las cigosporas producidas en los cruzamientos se transfirieron sobre papel de filtro estéril y húmedo en cajas de Petri y se incubaron a 22°C el tiempo que fue necesario hasta su germinación, evitando la desecación y manteniendo la esterilidad.

Los cruces UBC21 x B2 y UBC21 x A905 germinaron las cigosporas sobre tres meses tras su recolección. De estos cruzamientos se recogieron un total de 97 descendientes de un total de 97 cigosporas.

Los cruces A56 x A98 y A56 x A346 germinaron las cigosporas tras 6 meses desde su recolección. De estos cruzamientos se recogieron un total de 74 descendientes. En este caso se recogió varios descendientes de cada cigospora.

3.3 Medios y condiciones de cultivo para *Neurospora crassa*.

El medio utilizado para el crecimiento de *Neurospora* fue medio mínimo Vogel (Vogel, 1956; 1964) con diferentes fuentes de carbono dependiendo del experimento.

Para realizar los diferentes medios de *Neurospora* se necesitan los siguientes stocks:

- **Sales de Vogel 50X:** 125 g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 250 g de KH_2PO_4 anhidro, 10 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 g de NH_4NO_3 anhidro, 5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 ml de solución de biotina y 5 ml de solución de oligoelementos se disolvieron secuencialmente en 775 ml de agua destilada. Luego se llenó hasta 1 litro y se añadieron 5 ml de triclorometano como conservante. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se disolvió previamente en 20 ml de agua destilada y se añadió lentamente a solución de sales para evitar su precipitación.
- **Solución de Biotina:** Se disolvieron 5 mg de biotina en 100 ml de etanol al 50%. Se almacenó conservó en el congelador a -20°C .
- **Elementos traza:** 5 g de ácido cítrico $\cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,05 g de H_3BO_3 y 0,05 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se disolvieron secuencialmente en 95 ml de agua destilada. Se almacenó a 4°C protegido de la luz.

3.3.1 Medio líquido

Los cultivos líquidos se utilizaron en placas de Petri o matraces y se usaron para extracciones de ADN, ARN y proteínas. El detergente Tween 80 se utilizó para evitar la formación de hifas aéreas y la conidiación permitiendo que los micelios se desarrollaran vegetativamente. Los cultivos líquidos se inocularon con suspensiones de conidios y se incubaron a 30°C o 34°C dependiendo del experimento durante 24 o 48 horas. El medio para este propósito es:

-**Medio mínimo líquido con sacarosa:** 1X sales Vogel, 2% [w/v] sacarosa, 0.2% [v/v] Tween 80.

3.3.2 Medio sólido

Se utilizaron cultivos sólidos para la propagación de las cepas, la producción de conidios, el crecimiento colonial, las transformaciones de placas, las cepas de cruce y la inducción del desarrollo.

3.3.2.1 Propagación de las cepas.

Las cepas se mantuvieron en los tubos inclinados que contenían 5 ml o 1,5 ml de medio respectivamente. El medio fundido se añadió a los tubos y se inclinaron antes de la solidificación para obtener una fina capa de medio para favorecer la conidiación. Los cultivos inoculados se incubaron a 34°C durante dos días y luego se expusieron a ciclos de luz y oscuridad en la poyata para favorecer la conidiación. Se utilizó medio suplementado con higromicina para cepas portadoras de una copia del gen *hph* que confiere resistencia a la higromicina y su inactivación por fosforilación.

Los medios utilizados para este propósito son:

- Medio mínimo con sacarosa:** 1X sales de Vogel, sacarosa al 2% [p/v], agar al 1,5%[p/v].
- Medio mínimo con sacarosa / Hygromicina B:** 1X sales de Vogel, 2% [p/v] de sacarosa, 1,5%[p/v] de agar, 200 µg/ml de higromicina B (Roche®).

3.3.2.2 Recolección de conidios

Se llenaron frascos de 250 ml con 50 ml de medio fundido. Antes de la solidificación del agar, el medio fundido se extendió en los frascos de las paredes para obtener una fina capa de medio para favorecer la conidiación. Se inocularon conidios y se cultivaron durante 2 días a 34°C. Luego se expusieron a ciclos de oscuridad y luz en la poyata durante al menos 2 semanas para asegurar la maduración de las esporas antes de la recuperación. Los conidios se recuperaron utilizando 50 ml de sorbitol 1M y matraces de agitación durante 5 minutos. Entonces, la suspensión conidial se filtró a través de una estopilla. Los conidios se cuantificaron en una cámara de Bürker y las existencias de conidios se almacenaron a -20°C hasta su uso. Los medios utilizados para este propósito son:

- Medio mínimo con sacarosa:** 1X sales de Vogel, sacarosa al 2% [p/v], agar al 1,5%[p/v].
- Sacarosa media mínima / Hygromicina B:** 1X sales de Vogel, 2% [p/v] de sacarosa, 1,5%[p/v] de agar, 200 µg/ml de higromicina B (Roche®).

3.3.2.3 Crecimiento colonial.

El crecimiento colonial de *Neurospora* se obtiene utilizando la sorbosa como principal fuente de carbono en el medio. *Neurospora* no puede usar sorbosa para el crecimiento, así que el micelio tiene una extensión limitada y la producción del conidial se reduce. Este medio fue utilizado para transformaciones de placas y ascosporas, y la progenie de cruces. Se utilizó la suplementación con higromicina para la selección de transformantes con una copia del gen *hph*. Los medios se conocen como FGS o FGS con higromicina.

-Medio mínimo con sorbosa (FGS): 1X sales de Vogel, agar al 1,5% [p/v], solución 1X de solución FGS.

-Medio mínimo con sorbosa / higromicina B (FGS + higromicina): 1X sales de Vogel, agar al 1,5% [p / v], 1X de la solución FGS, 300 µg/ml de higromicina B (Roche®)

• **Solución de FGS 10X:** sorbosa al 10% [p/v], 0,5% [p/v] de glucosa, fructosa al 0,5% [p/v].

3.3.2.4 Medio de cruce.

Se usó medio de cruce sintético para cruzar dos cepas de diferentes tipos de apareamiento (Cornell University. Dept. of Plant Breeding, n.d.). Las placas de Petri se rellenaron con 25 ml de medio de cruce y se inocularon con conidios o una pequeña cantidad de micelio de las dos cepas colocadas opuestas entre sí. Se incubaron a temperatura ambiente y se sellaron con parafilm durante unas pocas semanas hasta que se liberaron los ascosporas. Las ascosporas se recuperan con agua de la tapa de la placa de Petri y se activan por calor (60°C, 45 min) antes del cultivo en medio FGS.

El medio de cruce está compuesto por: 10 g/l de sacarosa, 1 g/l KNO₃, 0,7 g/l K₂HPO₄, 0,5 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l MgSO₄ · 7H₂O, 0,1 g/l NaCl, 0,1 g/l de Cl₂Ca, 0,1 ml/l de elementos traza, 0,1 ml/l de biotina y 20 g de agar.

3.3.2.5 Inducción del desarrollo.

La inducción de desarrollo se llevó a cabo como se ha descrito previamente por (Bailey-Shrode & Ebbole, 2004) con algunas modificaciones menores (Bailey-Shrode & Ebbole, 2004). Las cepas se cultivaron durante 24 horas sobre medio líquido en

matraces a 30°C y luego se recogieron en papel de filtro y se lavaron. Las tortas de micelio sobre el papel de filtro se invirtieron sobre un segundo papel de filtro sobre una placa con medio Vogel que contenía 0,45% [p/v] de agar. Los cultivos se incubaron a 30°C durante diferentes tiempos dependiendo del experimento. El micelio debe crecer primero a través de papel de filtro para obtener aire, y luego las hifas aéreas pueden ser cosechadas por separado del micelio vegetativo inferior que crece entre los dos papeles de filtro.

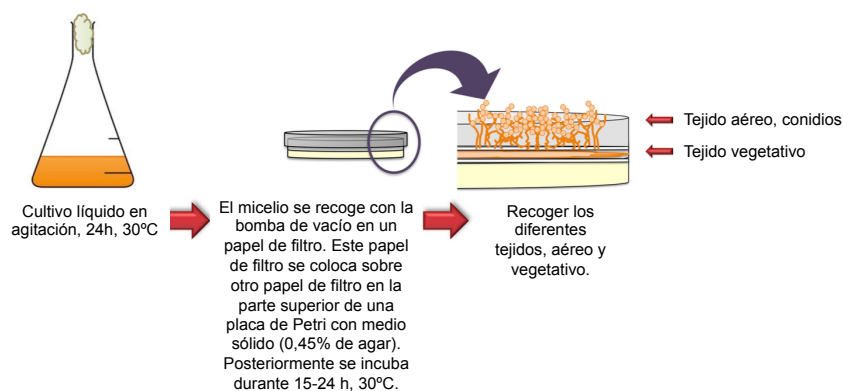


Figura MM1: Método de inducción al desarrollo basado en {BaileyShrode:2004wd}. Modificado de (Ruger-Herreros, 2014).

3.4 Medios y condiciones de cultivo para *Aspergillus nidulans*.

Los medios de cultivo utilizados para cultivar este hongo han sido descritos en (Pontecorvo et al., 1953). De forma generalizada se ha utilizado medio mínimo (MMA) líquido o sólido añadiendo los suplementos apropiados en caso de los mutantes auxótrofos.

3.4.1 Disoluciones utilizadas (preparación por litro):

- Solución de sales 50X:** 26 g KCl, 76 g KH_2PO_4 anhidro, 26 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 2.5 ml de elementos traza fueron disueltos en 775ml de agua destilada. Entonces, fue enrasado a 1 litro y autoclavado.
- Elementos traza (1000X):** 22 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11g H_3BO_3 , 5g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 3,14g $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,6g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,6g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,1g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 50g Na_2EDTA . Ajustar con KOH a pH 6,8. Esterilizar por autoclavado.
- Disolución de glucosa (10X):** 200g de glucosa. Esterilizar por autoclavado.
- Disolución de tartrato amónico (100X):** 92g de tartrato amónico. Esterilizar por autoclavado.

3.4.2 Medio Mínimo de *Aspergillus* con nitrato

Este medio se utilizó para el crecimiento y esporulación de las distintas cepas utilizadas en esta tesis. Este medio está compuesto por (preparación por litro): 6g NaNO_3 , 1,5g KH_2PO_4 anhidro, 0,5 g KCl, 0,54g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15g agar, 0,5ml elementos traza. Ajustar pH a 6,8 y autoclavar. Después de autoclavar añadir 100ml de glucosa 10X. En el caso de los mutantes auxótrofos para *pyro*, se añade piridoxina-HCl a una concentración final de 2,5 μM . Para los mutantes *pyrG* suplementar el medio con 5mM de uridina y 5mM de uracilo. Para disolver el uracilo y la uridina se necesita calentar el agua donde se van a disolver y una vez disuelto añadir al medio antes de autoclavar.

3.4.3 Medio Mínimo líquido con tartrato amónico.

Este medio se utilizó para la obtención e protoplastos y posterior transformación de las estirpes. El medio está compuesto por (preparación por litro): 20ml de solución de sales 50X y 0,3 ml de elementos traza. Ajustar el pH a 6,8 con NaOH y autoclavar. Una vez autoclavado, añadir 30ml de glucosa 10X, 15ml de tartrato amónico 100X y los suplementos necesarios para las distintas auxotrofías.

3.4.4 Medio de Regeneración (MMR):

Este medio se utilizó en los experimentos de transformación de *Aspergillus* y se compone de (preparación para un litro): 20ml de solución de sales 50X, 342g de sacarosa (1M). Ajustar el pH a 6,8 con NaOH y añadir 15g agar. Autoclavar y luego añadir 100ml de glucosa 10X y 10ml de tartrato amónico 100X.

3.4.5 Medio de Regeneración-TOP (MMR-TOP):

Este medio se utilizó en los experimentos de transformación de *Aspergillus* y se compone de (preparación para un litro): 20ml de solución de sales 50X, 342g de sacarosa (1M). Ajustar el pH a 6,8 con NaOH y añadir 6g agar. Autoclavar y luego añadir 100ml de glucosa 10X y 10ml de tartrato amónico 100X.

3.4.6 Watch Minimal Medium (WMM *Aspergillus*):

Este medio se utilizó para la visualización de las proteínas etiquetadas en *Aspergillus*. El WMM está compuesto por (preparación para un litro): 1,28g KCl, 1,24g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,92g tartrato amónico, 3,44g NaH_2PO_4 , 1ml de elementos traza y 23,52ml de glicerol al 85%. Ajustar el pH a 5,5. En el caso de los mutantes auxótrofos

para *pyro*, se añade piridoxina-HCl a una concentración final de 2,5µM. Para los mutantes *pyrG* suplementar el medio con 5mM de uridina y 5mM de uracilo. Para disolver el uracilo y la uridina se necesita calentar el agua donde se van a disolver y una vez disuelto añadir al medio. Este medio no se autoclavó porque precipitan las sales; así que una vez preparados se filtra.

3.5 Medios de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae*:

Las levaduras se cultivaron a 30°C durante diferentes tiempos dependiendo de la propósito del experimento. Los medios utilizados en el trabajo con levaduras fueron:

- YPD:** 1% [p/v] de extracto de levadura, 2% [p/v] de bactopectona, 2% [p/v] de glucosa. Añadir 2% [p/v] de agar para medio sólido.
- Medio SC mínimo:** 0,17% [p/v] YNB sin NH₄SO₄ ni aminoácidos, NH₄SO₄ al 0,5% [p/v], glucosa al 2% [p/v]. Añadir 2% [p/v] de agar para medio sólido. Suplemento con aminoácidos si es necesario.

3.6 Medios de cultivo para *Escherichia coli*.

El medio utilizado para el crecimiento y mantenimiento de las cepas de *Escherichia coli* fue el medio LB (Luria & Borrous, 1957) con los suplementos antibióticos apropiados. Los cultivos se realizan por inoculación de una única colonia en cultivos líquidos o sólidos y se cultivaron a 37°C durante 12 horas. Los medios utilizados están compuestos por:

- Medio Luria-Bertani:** 10 g de triptone, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl se disolvieron secuencialmente en 950 ml de agua destilada, se llenaron hasta 1 litro y se ajustó el pH a 7,5 antes del autoclave. Los cultivos sólidos se suplementaron con agar al 2%[p/v].
- Stock ampicilina:** 10% [p/v] de ampicilina sódica en agua destilada. Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C. Uso en medio LB a 0,01% [p/v].
- Stock kanamicina:** 5% [p/v] de ampicilina sódica en agua destilada. Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C. Uso en medio LB a 0,005% [p/v].

4. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.

4.1 Extracción de ADN

El ADN de los hongos utilizados en esta tesis se extrajo de micelios cultivados en medio o agar mínimos por dos métodos distintos. Para obtener ADN en alta concentración en *Phycomyces* se utilizó el método desarrollado por Weinkove (Weinkove et al., 1998) o para minipreparaciones se usó GenElute Plant Genomic DNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich).

Los ADN plasmídico se aislaron a partir de cultivos líquidos de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* cultivados durante 12 horas a 37°C o 30°C usando el kit GenElute Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich). Los cultivos de levadura se centrifugaron, se resuspendieron en 640 µl de solución de zimolasa y se incubaron a 37°C durante 1 hora antes del aislamiento del plásmido. La solución de zimolasa contiene: 0.9 M sorbitol, 0.1 M EDTA pH 8, 0.01% [v/v] β-mercaptoetanol, 150 µg de zimolasa 20T.

4.2 Extracción de ARN.

Aproximadamente 100mg de micelio se mezclaron con *RLC Buffer* (RNeasy Plant Mini kit-QUIAGEN), con 1,5 g de perlas de zirconio (0,5 mm de diámetro) y se sometieron a dos pulsos de 0,5 min en un homogeneizador celular (FastPrep-24, MP Biomedicals). Posteriormente se siguió el procedimiento del RNeasy Plant Mini kit-QUIAGEN. Las muestras de ARN fueron tratadas con DNase I (USB) antes de su uso en los experimentos de RT-PCR cuantitativa.

5. Reacción en cadena de la polimerasa.

5.1 PCR convencional.

La reacción de PCR convencional se hizo usando la polimerasa GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (PROMEGA) mezclando: 1,5 µl de oligonucleótidos (10 µM), 1µl of dNTPs (10 mM de cada nucleótido), 10 µl de 5X Green GoTaq Flexi Buffer, 5 µl de MgCl₂ 25mM, 1,25 U de polimerasa y 1 µl ADN (10-50 ng) y añadir agua destilada hasta llegar a 50 µl . La reacción consistió en 1 ciclo de 3 minutos a 94°C, 35 ciclos para la amplificación del ADN incluyendo 30s a 94°C, 30s a la temperatura determinada para los pareja de cebadores, y una tiempo variable a 72°C o 68°C dependiendo de la longitud del producto de PCR, generalmente 1 minuto por cada kb. Tras estos ciclos, se

añadió un ciclo de 5 minutos a 72°C. La polimerasa GoTaq se ha utilizado para PCRs de comprobación de clonaciones.

Para las PCRs realizadas en el Capítulo 1 para la localización del gen *madC* de *Phycomyces* se usó la polimerasa AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems). La mezcla para la PCR consistía en: 1,5 µl de oligonucleótidos (10 µM), 1µl of dNTPs (10 mM de cada nucleótido), 5 µl de 10X PCR Buffer con 15mM de MgCl₂ 25mM, 1,25 U de polimerasa y 1 µl ADN (10-50 ng) y añadir agua destilada hasta llegar a 50 µl . La reacción consistió en 1 ciclo de 3 minutos a 94°C, 35 ciclos para la amplificación del ADN incluyendo 30s a 94°C, 30s a la temperatura determinada para los pareja de cebadores, y una tiempo variable a 72°C o 68°C dependiendo de la longitud del producto de PCR, generalmente 1 minuto por cada kb. Tras estos ciclos, se añadió un ciclo de 5 minutos a 72°C.

Los productos de PCR utilizado para las clonaciones de la tesis se hicieron usando la polimerasa Expand High Fidelity PCR System (Roche) mezclando: 1,5 µl de oligonucleótidos (10 µM), 1µl of dNTPs (10 mM de cada nucleótido), 5 µl de Buffer 3, 5 µl de MgCl₂ 25mM, 1,25 U de polimerasa y 1 µl ADN (10-50 ng) y añadir agua destilada hasta llegar a 50 µl . La reacción consistió en 1 ciclo de 3 minutos a 94°C, 35 ciclos para la amplificación del ADN incluyendo 30s a 94°C, 30s a la temperatura determinada para los pareja de cebadores, y una tiempo variable a 72°C o 68°C dependiendo de la longitud del producto de PCR, generalmente 1 minuto por cada kb. Tras estos ciclos, se añadió un ciclo de 5 minutos a 72°C.

5.2 RT- PCR cuantitativa.

Para los experimentos de expresión génica se realizó RT-PCR cuantitativa en un LightCycler 480 II (Roche) utilizando el Kit de RT-PCR PrimeScript™ de One Step (Takara Bio Inc.), 0,2 µM de cada cebador y 50 ng de ARN en una reacción de 10 µl . La reacción consistió en 5 min a 42°C, seguido por 10s a 95°C, y luego 40 ciclos de amplificación de ADN (5s a 95°C y 20s a 60°C). Después de cada PCR se realizó análisis de la curva de fusión para mostrar la amplificación específica de segmentos de ADN único y la ausencia de ADN amplificado no específico. Las comparaciones de ambos protocolos mostraron consistencia y fiabilidad entre ambos métodos. La señal fluorescente obtenida para cada gen se normalizó a la señal fluorescente

correspondiente obtenida con *tub-2* (*Neurospora crassa*) y *actA* (*Phycomyces blakesleeanae*) para corregir los errores de muestreo.

6. Transformación de *Escherichia coli*.

6.1 Choque térmico.

El método de choque térmico se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Se mezclaron células competentes (50 μ l) con la cantidad apropiada de ADN y se incubaron durante 10 minutos sobre hielo. Luego se incubaron durante 15 segundos a 42°C y se pusieron inmediatamente en hielo durante 3 minutos. Se añadieron 1 ml de medio LB a las células y se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación moderada. Después de este tiempo, se sembraron 100 μ l de suspensión de células en una placa Petri con 25 ml de medio sólido LB con el antibiótico apropiado y el resto se centrifugó y el sedimento se extendió en una placa diferente. Las placas se cultivaron durante 12 horas a 37°C. Este método se usó normalmente para amplificar vectores.

7. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*.

La transformación de *Saccharomyces cerevisiae* se realizó siguiendo un protocolo modificado de (Gietz & Woods, 2002). Se inoculó una única colonia de la cepa FY834 en matraces de 100 ml con 25 ml de medio YPD y se cultivó durante 12 horas a 30°C con agitación. A continuación, el cultivo se diluyó hasta 0,2 DO600 en 25 ml de YPD y se incubó a 30°C hasta alcanzar 0,7 DO600. Las células se recuperaron y se lavaron con agua destilada por centrifugación. Las células se lavaron una vez con 500 μ l de SOLUCIÓN-I (SLN-I) y finalmente se resuspendieron en 250 μ l de SLN-I. Para cada transformación, se mezclaron 50 μ l de suspensión celular, 120 ng de plásmido linealizado pRS426, 5 μ l de cada flanco de PCR, 1 μ l de ADN de esperma de salmón (100 ng / μ l) y 300 μ l de SOLUCIÓN II (SLN-II) con se mezcló con ayuda de la pipeta para incubarlo a 30°C durante 30 minutos. Las células se sometieron entonces a choque térmico a 42°C durante 15 minutos seguido de 3 minutos de incubación en hielo. Las levaduras se recuperaron y se lavaron con agua destilada por centrifugación, se resuspendieron sobre 1 ml de YPD y se incubaron durante al menos 1 hora a 30°C con agitación. Las células finalmente se centrifugaron, se resuspendieron en 150 μ l de agua destilada estéril y se extendieron sobre placas SC-URA. Las colonias individuales

aparecerán en los siguientes 3-4 días y se verifican para la construcción deseada por PCR de las colonias. Este método se usa para la generación de los casetes que se van a usar para etiquetar genes en *Neurospora crassa*.

Soluciones necesarias:

-TE 10X: 0.1 M Tris-HCl pH 8, 0.01 M EDTA.

-SLN-I: TE 1X, 0.1 M acetato de litio.

-SLN-II: TE 1X, 0.1 M acetato de litio, 40 % [w/v] PEG 3500.

8. Transformación de *Neurospora crassa*.

8.1 Generación del casete para el etiquetado de genes.

La generación de proteínas marcadas en *Neurospora crassa* se realizó siguiendo el método descrito por (Honda & Selker, 2009) con algunas modificaciones. Este método se basa en la generación de un casete de *knock-in* que permite la adición de una etiqueta en el C-terminal de la proteína. La generación de casetes de marcaje implica la generación de dos flancos de aproximadamente 1,2 kb cada uno, uno justo antes del codón de parada (5') y el otro después del codón de parada (3') en la región intergénica. Cada flanco se obtiene por PCR usando cebadores con una cola complementaria al fragmento marcador obtenido por digestión de plásmidos que contienen un enlazador de poliglicina antes del epítopo que es seguido por el marcador seleccionable *hph* para conferir resistencia a la higromicina. Los tres fragmentos (dos productos de PCR y un fragmento digerido lineal) y el plásmido linealizado pRS426 se usaron para fabricar los casetes de knock-in por recombinación en una cepa auxotrófica de *S. cerevisiae* (Oldenburg et al., 1997).

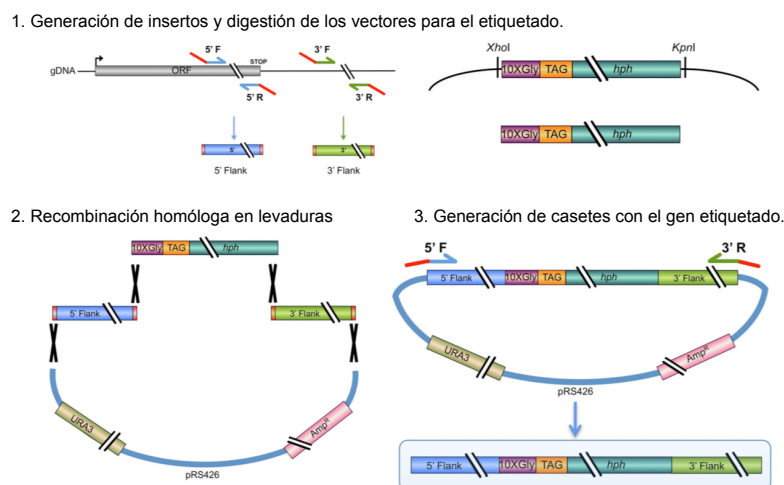


Figura MM2: Generación de casetes de etiquetado knock-in por recombinación homóloga en levaduras. Modificado de (Ruger-Herreros, 2014).

8.2 Transformación del etiquetado.

La transformación de *Neurospora crassa* se realizó por electroporación (Colot et al., 2006). La cepa mutante *Amus-52::bar* se creció para obtener conidios maduros que se cosecharon con sorbitol frío 1 M. El número de conidios se determinó contando en una cámara de Burkner y alrededor de 10^8 conidios en un volumen de 40 μ l de sorbitol 1 M se colocaron en una cubeta de electroporación con 5-10 μ l de producto de PCR (0,2 a 1 μ g) del casete. La electroporación se realizó con un instrumento BTX Electro Cell Manipulator (Modelo ECM 630) a 1500V, 600 Ω y 25 μ F. Después del electro-pulso 1 ml de frío 1 M sorbitol se añadió de inmediato a la cubeta. Se mezcló una cantidad de 150 μ l de la suspensión conidial con 850 μ l de solución de regeneración y se incubó durante al menos 2 horas a 30°C con agitación moderada. A continuación, la suspensión conidial se añadió a 5 ml de agar de regeneración y se extendió en placas de FGS suplementadas con extracto de levadura e higromicina.

Los medios requeridos son:

- Solución de recuperación:** Vogel 1X, extracto de levadura al 2% [p/v].
- Agar de regeneración:** 1X sales de Vogel, extracto de levadura al 2% [p/v], Sorbitol 1M 1%[p/v], agar, solución de FGS 1X, 300 μ g/ml de higromicina B (Roche)
- Medio mínimo para las transformaciones:** 1X sales de Vogel, agar al 1,5% [p/v], solución 1X FGS, 300 μ g/ml Higromicina B (Roche).

8.3 Transformación con el plásmido pMF272.

Esta transformación fue utilizada para introducir el gen *carC* de *Phycomyces* en *Neurospora* (Capítulo 2). El plásmido pMF272 (Freitag et al., 2004) está diseñado para insertar el gen de interés contiguo al gen *his-3* de *N. crassa*. La cepa mutante *his-3 al-3* se creció en Vogel sólido con histidina (0,1 mg/ml) para obtener conidios maduros que se cosecharon con sorbitol frío 1 M. El número de conidios se determinó contando en una cámara de Burkner y alrededor de 10^8 conidios en un volumen de 40 μ l de sorbitol 1 M se colocaron en una cubeta de electroporación con 5-10 μ l de producto de PCR (0,7 a 1 μ g) del plásmido con el gen de interés. Antes de transformar se eliminó la resistencia a ampicilina mediante digestión con NdeI y DraIII para linearizar el plásmido. La electroporación se realizó con un instrumento BTX Electro Cell Manipulator (Modelo

ECM 630) a 1500V, 600 Ω y 25 μ F. Después del electro-pulso 1 ml de frío 1 M sorbitol se añadió de inmediato a la cubeta. Se mezcló y los conidios electroporados se repartieron en 5 placas de FGS (200 μ l por placa) y se incubó durante al menos 2 días a 34°C. Posteriormente los transformantes obtenidos se pasaron de la placa de FGS a tubos de Vogel sólido inclinado. Este paso se realizó al menos tres veces para purificar los núcleos transformados. Los medios requeridos para este experimento están descritos en la secciones 3.2.2.1 y 3.2.2.3 de los Materiales y Métodos de esta tesis.

9. Proteínas.

9.1 Extracción de proteínas totales.

Los micelios (100mg) se mezclaron diferentes volúmenes de tampón PEB que contenía inhibidores de proteasas y fosfatasas y se trituró con 1,5 g de perlas de zirconio (0,5 mm de diámetro), sometiendo la mezcla a dos pulsos de 0,5 min en un homogeneizador celular (FastPrep-24, MP Biomedicals). Después de triturar los micelios, los extractos crudos se centrifugaron a 13000 rpm y 4°C. Los sobrenadantes se recogieron, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Las concentraciones de proteínas se midieron por espectrometría usando un instrumento Nanodrop (Abs 280 nm) o un ensayo de Bradford (Bradford, 1976).

Las soluciones utilizadas son:

-PEB: 50 mM HEPES pH 7.4, 10% [v/v] glicerol, 137 mM NaCl, 5 mM EDTA.

-Inhibidores de proteasas: leupeptina (1 μ M), pepstatina (1 μ M), and PMSF (50 μ M).

9.2 Western blot.

Las proteínas de lisados celulares totales, fracciones citoplasmáticas, nucleares o inmunoprecipitadas se sometieron a SDS-PAGE sobre geles de acrilamida: bisacrilamida (29:1) al 7,5% o 10%. Las muestras se resuspendieron en tampón Laemmli 1X y se hirvieron durante 5 minutos antes de cargar en geles. Las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE usando el tampón 1X SDS-Running. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de transferencia de nitrocelulosa (GE Healthcare). Como marcador de peso molecular se utilizaron las Precision PlusTM Standards All Blue de Bio-Rad. La carga igual se confirmó mediante membranas de tinción con solución de Ponceau S. Las membranas se lavaron durante 15 minutos antes de bloquear usando TBS 1X. El bloqueo se llevó a cabo utilizando una

solución de bloqueo durante al menos 1 hora con agitación moderada a temperatura ambiente antes de la incubación con anticuerpos primarios. Los anticuerpos utilizados en esta tesis se detallan en la tabla TMM.3. Los anticuerpos secundarios utilizados se conjugaron con la peroxidasa de la planta *Armoracia rusticana* (rábano). La actividad de la peroxidasa se detectó usando quimioluminiscencia (ECL Prime Reagent GE Healthcare).

Las soluciones utilizadas son:

- Laemmli Buffer (4X)**: Tris-HCl 240 mM pH 6,8, SDS al 8% [p/v], glicerol al 40% [v/v], β -mercaptoetanol al 4% [p/v] Bromofenol azul.
- Gel de acrilamida al 4% (*stacking*)**: 4% [p/v] bisacrilamida (29: 1), Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS al 0,1% [p/v], APS al 10% [p/V], 0,2% [v/v] TEMED.
- Gel de acrilamida al 10% (*running*)**: 7,5%, acrilamida al 10% [p/v]: bisacrilamida (29: 1), Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS al 0,1% [p/v], 0,5% APS 10% [p/v], 0,2% [v/v]TEMED.
- Tampón SDS-Running(10X)**: 0,4 M Tris base, 1,2 M Glicina, 1% [p/v] SDS.
- Tampón de transferencia semi-seca**: base de Tris 20 mM, glicina 150 mM, metanol al 20%[v/v],0,05%[P/v]SDS.
- Solución Ponceau S**: 0,1% [p/v] Ponceau S, 3% [p/v] TCA.
- TBS (10X)**: NaCl 1,5 M, base Tris 33 mM. Ajustar a pH 7.5.
- Solución de bloqueo**: Leche desnatada al 5% [p/v] (Difco), TBS 1X.

Tabla TMM.3. Anticuerpos usados en esta tesis:

Anticuerpo	Tipo	Concentración	Uso
FLAG	Monoclonal	1/10000	Western blot, IP
TUB	Monoclonal	1/1000	Western blot
hH2B	Policlonal	1/4000	Western blot
WcoB	Policlonal	1/1000, 1/100	Western blot, IP
Ubiquitina	Policlonal	1/1000	Western blot

9.3 Tinción de geles de poliacrilamida.

9.3.1 Tinción Coomassie.

Los geles de acrilamida se tiñeron usando solución de Coomassie durante 1 hora a temperatura ambiente. Para visualizar los geles de proteínas, a continuación, se

sumergen en solución de destinción en agitación a temperatura ambiente hasta que se consiga la nitidez de bandas deseada.

-Solución de tinción de Coomassie: metanol al 45% [v/v], ácido acético al 10% [v/v], Azul de Coomassie al 0,1%[p/v].

-Solución de destinción: metanol al 5% [v/v], ácido acético al 7,5% [v/v].

9.3.2 Tinción con plata.

La tinción con plata de geles se realizó después de cada inmunoprecipitación de proteínas. Las muestras se cargaron en geles SDS a 4-12% de acrilamida (Invitrogen) y después de la electroforesis se lavaron durante 5 minutos con agua bidestilada antes de la tinción con plata usando el kit comercial SilverQuest™ (Invitrogen).

10. Fraccionamiento subcelular y aislamiento de núcleos.

10.1 *Phycomyces blakesleeianus*.

Esta técnica se ha desarrollado conforme a lo descrito en (Cohen, 1978) con algunas modificaciones. Para el aislamiento de núcleos se necesitan entre 5-8 g de micelio que fueron crecidos en medio mínimo líquido para *Phycomyces* en luz y en oscuridad durante 72 horas en agitación (200 rpm) a 22°C. Los micelios se secaron al vacío, se congelaron en nitrógeno líquido y se trituraron a un polvo fino en nitrógeno líquido usando un mortero y una maja. El micelio triturado se mezcló con 25 ml de tampón H y se agita hasta su correcta homogenización. La mezcla es pasada a través de dos gasas y el extracto obtenido se centrifuga a 8000 rpm, 4°C durante 15 minutos en un rotor SW32Ti (Beckman). Se conserva una alícuota (1 ml) del sobrenadante que será el extracto total (ET). A continuación, se le añade al pellet 2 ml de tampón H y se resuspende el pellet. En este momento en un tubo de ultracentrífuga se añade 4,5 ml de gradiente de sacarosa y encima se añade los 2 ml de mezcla de lo resuspendido anteriormente. Se centrifuga a 29000 rpm a 4°C durante 1 hora en el rotor SW32Ti (Beckman). Se conserva una alícuota del sobrenadante y el pellet se resuspende en 500 µl de tampón de núcleos (fracción nuclear). La fracción nuclear fue sonicada 1 s on, 2 s off, 50% de output en el sonicador Sonoplus HD 2070 / UW 2070 con la punta MS 72. Las soluciones necesarias son:

-Tampón H: 0,75 M sacarosa, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M EDTANa₂, 15 mM MgCl₂, 40 mM KCl.

-**Gradiente de Sacarosa:** 2,2 M sacarosa, 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5 M EDTA Na_2 , 15 mM MgCl_2 , 40 mM KCl.

-**Tampón de núcleos:** 50 mM de HEPES pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 0,1% de desoxicolato, 0,1% de SDS.

10.2 *Neurospora crassa*.

Los lisados y núcleos celulares totales se prepararon de acuerdo con un método descrito por Baum y Giles con algunas modificaciones menores (Baum & Giles, 1985; Froehlich et al., 2002; Schwerdtfeger & Linden, 2000a). Los micelios (4-5 g de peso húmedo) crecidos en medio líquido se recogieron, se secaron al vacío, se congelaron en nitrógeno líquido y se trituraron a un polvo fino en nitrógeno líquido usando un mortero y una maja. El tejido en polvo se mezcló con 8 ml de tampón A. El extracto bruto se filtró a través de una gasa y 2 vol. del tampón B al filtrado con agitación. El homogeneizado se colocó después en capas sobre 10,4 ml de tampón C en un tubo Ultra-Clear (25x89 mm, Beckman) y se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos a 4°C en un rotor SW32Ti (Beckman) para eliminar el residuo celular. Se tomaron alícuotas del sobrenadante (1 ml, lisado celular total), se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. El sobrenadante restante se colocó a continuación en capas en un gradiente de sacarosa de 5 ml y se centrifugó a 9400 g durante 30 minutos a 4°C en un rotor SW32Ti. Se tomaron alícuotas del sobrenadante (fracción citoplásmica), se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. El sedimento nuclear resultante se resuspendió en 0,5 ml de tampón D, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C. Todos los tampones contenían inhibidores de proteasas. Se usaron fracciones totales, citosólicas y nucleares para la transferencia de Western. Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976).

Las soluciones utilizadas están compuestas por:

-**Tampón A:** sorbitol 1 M, Ficoll al 7% [p/v], glicerol al 20% [v/v], acetato de magnesio 5 mM, EGTA 5 mM, CaCl_2 3 mM, DTT 3 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5.

-**Tampón B:** glicerol al 10% [v/v], acetato de magnesio 5 mM, EGTA 5 mM, Tris-HCl 25mM, pH7,5.

-**Tampón C:** Compuesto de una mezcla 1: 1,7 de tampones A y B.

-**Tampón D:** glicerol al 25% [v/v], acetato de magnesio 5 mM, DTT 3 mM, EDTA 0,1 mM, Tris - HCl 25 mM, pH 7,5.

-**Gradiente de sacarosa:** sacarosa 1 M, glicerol al 10% (v/v), acetato de magnesio 5 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 7,5.

-**Inhibidores de la proteasa:** leupeptina 1 μ M, pepstatina 1 μ M y PMSF 50 μ M.

11. Extracción de carotenos en *N. crassa*.

Aproximadamente 10^6 conidios se inocularon en 25 ml de medio líquido mínimo de Vogel con 0,2% de Tween 80. Las placas se cultivaron durante 48 horas a 22°C en oscuridad y luego fueron expuestas a una batería de bombillas fluorescentes (2W/m²) durante 2 minutos, excepto los controles de oscuridad. Posteriormente, tras la iluminación todas las placas se cultivan en oscuridad a 8°C durante 24 horas. Mantenido en la oscuridad como un control. Los micelios se recogieron, congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron. Los carotenoides se extrajeron de 0,05g de muestras de peso seco como se describe (Schmidhauser et al., 1994). Total de carotenoides fueron estimados a partir de las mediciones de los espectros de absorción máxima en hexano.

12. Inmunoprecipitación de proteínas en *Phycomyces*.

Se crecieron 10^6 esporas de la estirpe silvestre NRRL1555 en 500 ml de medio líquido mínimo durante 72 horas en agitación (200 rpm) a 22°C. El micelio se filtró al vacío y se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C. Los micelios se trituraron hasta obtener un polvo fino con ayuda nitrógeno líquido usando un mortero y una maja. Se mezcló el micelio en polvo en un tubo de 50 ml con 20 ml de tampón TAP con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche) y se disolvió mediante agitación con vórtex. Los pulsos de vórtex fueron seguidos por incubaciones de 5 a 10 minutos sobre hielo. Después de mezclar, los extractos crudos se centrifugaron a 10400 rpm a 4°C durante 20 minutos (rotor JA-20 Beckman). Se recogieron los sobrenadantes y se transfirieron a tubos de centrifugación. Después se centrifugaron de nuevo a 40500 rpm a 4°C durante 45 minutos (rotor Sorvall Beckman 70Ti). A continuación, se transfirió una fracción (1 ml) de cada sobrenadante a un tubo nuevo, marcado como "INPUT" de cada muestra y congelado en nitrógeno líquido y además recojo dos fracciones más de 1 ml cada una para continuar el inmunoprecipitación. A una de las

fracciones anteriores se le añade el anticuerpo contra WcoB (1:100) y a la otra no (control) y mantienen toda la noche a 4°C en una rueda giratoria. Tras esta incubación se añade a ambas fracciones incubadas 20 µl de perlas Protein A/G Agarose previamente equilibradas con TAP y se incubaron durante 3 horas a 4°C en una rueda rotatoria. Previamente se equilibraron 20 µl de perlas de agarosa Protein A/G Agarose (Santa Cruz Biotechnology) lavándolas tres veces con 1 ml de tampón TAP seguido de centrifugación a 2500 rpm a 4°C. Las perlas se recogieron entonces por centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos a 4°C (rotor SX4250). Se transfirió una fracción (1 ml) de cada sobrenadante a un nuevo tubo, marcado como cada muestra (FT) y se congeló en nitrógeno líquido. Las perlas se lavaron tres veces con 1 ml de tampón TAP por centrifugación a 2500 rpm a 4°C. Al final, se añadieron 60 µl de tampón LDS NuPAGE (Invitrogen) a las perlas y se incubaron durante 10 minutos a 72°C con agitación moderada. Las proteínas eluidas se recogieron por centrifugación a 2500 rpm a temperatura ambiente y se transfirieron a nuevos tubos marcados como "IP". Cada muestra se trató con DTT (concentración final 50 mM) y se incubó de nuevo durante 10 minutos a 72°C con agitación moderada. Las concentraciones de proteína de las muestras INPUT y FT se midieron por espectrometría usando un instrumento Nanodrop (Abs 280nm). Las muestras INPUT, FT e IP se utilizaron para la transferencia Western y las muestras IP se sometieron adicionalmente a tinción con Coomassie o plata. Las diferentes bandas de proteínas reveladas en el gel fueron identificadas mediante espectrometría de masa (MS/MS).

El tampón necesario para la inmunoprecipitación es:

-**Tampón TAP:** 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% [v/v] NP-40.

-**Cócktel de Inhibidores de proteasas (Roche):** 2 pastillas para 250ml de tampón TAP.

13. Microscopía óptica en *Aspergillus nidulans*.

13.1 Transformación de *Aspergillus nidulans*.

La transformación de *A. nidulans* se realizó siguiendo el protocolo establecido en (Etxebeste et al., 2008), modificado del descrito en (Tilburn et al., 1983). Para transformar este hongo primeramente se obtienen protoplastos partiendo de un micelio

vegetativo crecido en medio mínimo con tartrato amónico y posteriormente se transformaron con ADN circulares utilizando PEG para fusionar dichos protoplastos.

Se inocularon 10^6 esporas de la cepa a transformar en un matraz Erlenmeyer de un litro conteniendo 300 ml de medio mínimo con tartrato amónico suplementado con los nutrientes necesarios para las diferentes auxotrofías. El micelio creció durante 16 horas a 30°C y se recogió por filtración utilizando Miracloth (Calbiochem) estéril. Aproximadamente 1 g de germínulas húmedas se trataron para obtener protoplastos. A este micelio se le añadieron 10 ml de Solución 2 (Tabla MM2) y 200mg/g de Glucanex (Novozymes) y la mezcla se incubó en un matraz de 100 ml a 30°C, 120 rpm durante 3 horas.

Una vez obtenidos los protoplastos se llevó a cabo la purificación y el lavado de los mismos. La mezcla de digestión se diluyó a la mitad añadiendo Solución 2, dividiéndolo posteriormente en dos tubos. En cada tubo se añadieron lentamente 10 ml de Solución 5 (Tabla MM2), evitando que las dos soluciones se mezclen, formando así dos fases fácilmente distinguibles. Los tubos fueron centrifugados durante 18 minutos a 4500rpm a 4°C, tras lo cual la banda de protoplastos se formó en la interfase. Esta banda de protoplastos fue recogida y transferida a otro tubo donde se le añadió Solución 6 (Tabla MM2) en una relación 2 volúmenes de Solución 6 por cada volumen de solución de protoplastos. Los protoplastos se recogieron centrifugando esta suspensión a 4°C durante 18 minutos a 4500 rpm, y tras retirar el sobrenadante fueron suavemente resuspendidos en 1 ml de Solución 7 (Tabla MM2) y transferidos a tubos eppendorf de 1,5 ml.

Los protoplastos purificados se transformaron de la siguiente manera, añadiendo en un tubo Falcon de 50 ml:

- 50 µl de Solución 8 (Tabla MM2).
- Diferentes volúmenes de ADN (aprox. 10 µg) completando con Solución 7 hasta 50 µl.
- El volumen de la suspensión de protoplastos equivalente a $2 \cdot 10^6$ protoplastos.

Se mantuvieron los tubos en hielo durante 20 minutos, tras lo cual se añadió 1ml de Solución 8 a cada uno y se volvieron a incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron 3 ml de Solución 7 y alrededor de 45

ml de MMR-TOP precalentado a 50°C. Se mezcló y se vertió sobre medio sólido MMR selectivo (sin el marcador de la auxotrofia a complementar en cada transformación) y una porción de esta mezcla sobre MMR no selectivo (con suplementos para las diferentes auxotrofias de la cepa) a modo de control.

Soluciones utilizadas:

Solución 2 (50 ml): 14,6g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,8 ml Na_2HPO_4 0,2M; 0,7 ml NaH_2PO_4 0,2M; pH 5,5. Esterilizar por filtración. Hacer esta solución en el momento de su uso.

Solución 5 (100 ml): 10,9g Sorbitol 0,6M; 10 ml TrisHCl pH 7,5 (0,1M). Autoclavar y conservar en frío.

Solución 6 (100 ml): 18,22g Sorbitol 1 M; 1 ml TrisHCl pH 7,5. Autoclavar y conservar en frío. Autoclavar y conservar en frío.

Solución 7 (100 ml): 18,22g Sorbitol 1 M; 1 ml TrisHCl pH 7,5; 1 ml CaCl_2 1M. Autoclavar y conservar en frío.

Solución 8 (50 ml): 30g PEG4000 o PEG6000; 0,5 ml de TrisHCl 1M pH 7,5; 0,5 ml CaCl_2 1M. Autoclavar y conservar a temperatura ambiente. Para prepararlo añadir en 5 ml de agua destilada con el PEG, calentar en el microondas y enrasada hasta 50 ml con agua destilada.

13.2 Etiquetado con GFP.

Para etiquetar con GFP las proteínas MadA, MadB, WcoB y CarS de *Phycomyces* se clonaron los ADNc de dichos genes en el plásmido pSR46 (*pyr4*, *h2b(p)::GFP::gcnE*, *amp^r*). Este plásmido fue digerido con las enzimas *AscI* y *PacI* para eliminar el gen *gcnE* y clonar los genes de interés. Una vez hechas la clonaciones, se transformó el plásmido cerrado con los distintos genes de *Phycomyces* en la estirpe SVK103 (Tabla MM1.3). Los transformantes obtenidos fueron comprobados mediante microscopía de fluorescencia.

13.3 BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation)

En este caso con la proteína fluorescente bimolecular se realizó de manera diferente al etiquetado con GFP. Así, las proteínas a analizar fueron etiquetadas con mitades separadas de la proteína amarilla fluorescente (YFP), insertadas en los plásmidos pCK3 (*pyr4*, *alcA (p)::YFP-C-term::lreB*) y pSR120 (pVip) (*pyro*, *alcA*

(*p*::YFP-*N-term::vipA*) (Rauscher et al., 2016). Estos plásmidos fueron cedidos por el laboratorio del Prof. Reinhard Fisher, Universidad de Karlsruhe, Alemania. Tras amplificar los ADNc de los genes de interés, se insertaron en esos plásmidos quedando en fase la expresión del fragmento YFP y el gen candidato. Luego los plásmidos fueron transformados en la estirpe SVK103 de *A. nidulans* y analizados mediante microscopía.

13.4 Condiciones de cultivo para los experimentos de microscopía.

La localización intracelular de las proteínas etiquetadas se analizó in vivo cultivando las cepas en medio de cultivo líquido WMM (sección 3.3.6 de esta tesis) sobre cubres (Peñalva, 2005). Se comenzó a observar la localización de la fluorescencia desde la germinación de esporas manteniendo el cultivo a 30°C durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, se retira el exceso de medio de cultivo y se añade DAPI para localizar los núcleos.

13.4 Microscopio y obtención de imágenes.

Las imágenes de los cultivos in vivo, a 30°C, se tomaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse 90 Ti-E , equipado con una cámara Nikon DS-Qi2 con objetivo de aceite de inmersión Plan Apochromat 100X. Las imágenes fueron tratadas posteriormente con el programa Fiji (Image J v.2.0.0).

14. Ubiquitinación de WcoB en *Phycomyces*.

Para este experimentos se usaron las fracciones INPUT (extracto total de proteínas) e IP (fracción inmunoprecipitada) de las inmunoprecipitaciones de WcoB descritas en la sección 12 de los Materiales y Métodos de esta tesis. A continuación las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE al 7,5% y 10% de bisacrilamida (29:1) y las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada en PBS 1X con 0,1% Tween 20 y 1% BSA y hibridadas con anticuerpos contra Ubiquitina (1/1000) en PBS 1X con 0,1% Tween 20 durante 14 horas y posteriormente hibridados con un anticuerpo contra rabbit a una concentración 1/15000. Luego la membrana fue deshibridada y se volvió a bloquear, pero esta vez en leche al 5% e hibridada con anticuerpo contra WcoB (1/1000) durante 14 horas y luego hibridada con anti-rabbit (1/10000).

BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, Al, Q., Norton, T., Hill, A., LeClaire, L. & Fortwendel, J. (2016). A Fungus-Specific Protein Domain Is Essential for RasA-Mediated Morphogenetic Signaling in *Aspergillus fumigatus*. *mSphere* 1.
- Agardh, C. A. (1817). Synopsis algarum Scandinaviae: adjecta dispositione universali algarum. *Ex Officina Berlingiana, Lundae*.
- Aguilar, R. & Wendland, B. (2003). Ubiquitin: not just for proteasomes anymore. *Curr Opin Cell Biol* 15, 184-190.
- Ahmad, M. & Cashmore, A. R. (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366, 162-166.
- Alejandro-Durán, E., Roldán-Arjona, T., Ariza, R. & Ruiz-Rubio, M. (2003). The photolyase gene from the plant pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is induced by visible light and alpha-tomatine from tomato plant. *Fungal Genet. Biol.* 40, 159-165.
- Almeida, E. & Cerdá-Olmedo, E. (2008). Gene expression in the regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Curr. Genet.* 53, 129-137.
- Altincicek, B., Kovacs, J. L. & Gerardo, N. M. (2012). Horizontally transferred fungal carotenoid genes in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Biol. Lett.* 8, 253-257.
- Altman LJ, Ash, L., Kowerski, R., Epstein, W., Larsen, B., Rilling, H., Muscio, F. & Gergonis, D. (1972). A new intermediate in the biosynthesis of carotenoids. *J Am Chem* 94, 3257-3259.
- Alvarez, M. & Eslava, A. (1983a). Isogenic strains of *Phycomyces blakesleeanus* suitable for genetic analysis. *Genetics* 105, 873-879.
- Alvarez, M., Ootaki, T. & Eslava, A. (1983). Mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism induced by ICR-170. *Mol. Gen. Genet.* 191, 507-511.
- Alvarez, M. I. & Eslava, A. P. (1983b). Isogenic Strains of *Phycomyces blakesleeanus* Suitable for Genetic Analysis. *Genetics* 105, 873-879.
- Aragon, C., Murillo, F., la Guardia, M. & Cerdá-Olmedo, E. (1976). An enzyme complex for the dehydrogenation of phytoene in *Phycomyces*. *Eur. J. Biochem.* 63, 71-75.
- Arpaia, G., Loros, J., Dunlap, J., Morelli, G. & Macino, G. (1995). Light induction of the clock-controlled gene *ccg-1* is not transduced through the circadian clock in *Neurospora crassa*. *Mol. Gen. Genet.* 247, 157-163.
- Arpaia, G., Cerri, F., Baima, S. & Macino, G. (1999). Involvement of protein kinase C in the response of *Neurospora crassa* to blue light. *Mol. Gen. Genet.* 262, 314-322.
- Arrach, N., Fernández-Martín, R., Cerdá-Olmedo, E. & Avalos, J. (2001). A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 1687-1692.
- Avalos, J. & Cerdá-Olmedo, E. (1987). Carotenoid mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Curr. Genet.* 25, 1837-1841.
- Avalos, J. & Cerdá-Olmedo, E. (2004). Fungal carotenoid production. In *Handbook of Fungal Biotechnology*. Arora, D. K. (ed.) New York: Marcel Dekker, Inc., 367-378.
- Avalos, J. & Limón, M. (2015). Biological roles of fungal carotenoids. *Curr. Genet.* 61, 309-324.
- Bailey-Shrode, L. & Ebbole, D. J. (2004). The fluffy gene of *Neurospora crassa* is necessary and sufficient to induce conidiophore development. *Genetics* 166, 1741-1749.
- Ballario, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A. & Macino, G. (1996). White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J.* 15, 1650-1657.
- Ballario, P., Talora, C., Galli, D., Linden, H. & Macino, G. (1998). Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins. *Mol. Microbiol.* 29, 719-729.
- Barnett, H., Lilly, V. & Krause, R. (1956). Increased production of carotene by mixed + and - cultures of *Choanephora cucurbitarum*. *Science* 123, 141-142.
- Barrero, A., Herrador, M., Arteaga, P., Gil, J., González, J., Alcalde, E. & Cerdá-Olmedo, E. (2011). New apocarotenoids and β -carotene cleavage in *Blakeslea trispora*. *Org. Biomol. Chem.* 9, 7190-7195.
- Baum, J. & Giles, N. (1985). Genetic control of chromatin structure 5' to the *qa-x* and *qa-2* genes of *Neurospora*. *J. Mol. Biol.* 182, 79-89.
- Bayram O, Braus, G., Fischer, R. & Rodríguez-Romero, J. (2010). Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet. Biol.* 47, 900-908.
- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeier, S., Kwon, N., Keller, N. P., et al. (2008a). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320, 1504-1506.

- Bayram, O., Biesemann, C., Krappmann, S., Galland, P. & Braus, G. (2008b). More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Mol. Biol. Cell* 19, 3254-3262.
- Bejarano, E. & Cerdá-Olmedo, E. (1988). Inhibition of phytoene dehydrogenation and activation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Phytochemistry* 150, 209-214.
- Bejarano, E., Parra, F., Murillo, F. & Cerdá-Olmedo, E. (1988). End-product regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Mol. Gen. Genet.* 150, 209-214.
- Bejarano, E., Avalos, J., Lipson, E. & Cerdá-Olmedo, E. (1991). Photoinduced accumulation of carotene in *Phycomyces*. *Planta* 183, 1-9.
- Belden, W., Loros, J. & Dunlap, J. (2007a). Execution of the circadian negative feedback loop in *Neurospora* requires the ATP-dependent chromatin-remodeling enzyme CLOCK-SWITCH. *Mol. Cell* 25, 587-600.
- Belden, W. J., Larrondo, L. F., Froehlich, A. C., Shi, M., Chen, C., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (2007b). The band mutation in *Neurospora crassa* is a dominant allele of *ras-1* implicating RAS signaling in circadian output. *Genes Dev.* 21, 1494-1505.
- Bergman, K., Burke, P., Cerdá-Olmedo, E., David, C., Delbrück, M., Foster, K., Goodell, E., Heisenberg, M., Meissner, G., et al. (1969). *Phycomyces*. *Bacteriol Rev* 33, 99-157.
- Bergman, K., Eslava, A. & Cerdá-Olmedo, E. (1973). Mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism. *Mol. Gen. Genet.* 123, 1-16.
- Berrocal-Tito, G., Sametz-Baron, L., Eichenberg, K., Horwitz, B. & Herrera-Estrella, A. (1999). Rapid blue light regulation of a *Trichoderma harzianum* photolyase gene. *J. Biol. Chem.* 274, 14288-14294.
- Berrocal-Tito, G., Esquivel-Naranjo, E., Horwitz, B. A. & Herrera-Estrella, A. (2007). *Trichoderma atroviride* PHR1, a fungal photolyase responsible for DNA repair, autoregulates its own photoinduction. *Eukaryotic Cell* 6, 1682-1692.
- Bhat, R. A., Lahaye, T. & Panstruga, R. (2006). The visible touch: in planta visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant Methods* 2, 12.
- Bieszke, J., Braun, E., Bean, L., Kang, S., Natvig, D. & Borkovich, K. (1999). The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 8034-8039.
- Bieszke, J., Li, L. & Borkovich, K. (2007). The fungal opsin gene *nop-1* is negatively-regulated by a component of the blue light sensing pathway and influences conidiation-specific gene expression in *Curr. Genet.* 52, 149-157.
- Blakeslee, A. (1906). Zygospores and sexual strains in the common bread mould, *Rhizopus nigricans*. *Science* 24, 118-122.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brenna, A., Grimaldi, B., Filetici, P. & Ballario, P. (2012). Physical association of the WC-1 photoreceptor and the histone acetyltransferase NGF-1 is required for blue light signal transduction in *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell* 23, 3863-3872.
- Brinkhaus, F. L. & Rilling, H. C. (1988). Purification of geranylgeranyl diphosphate synthase from *Phycomyces blakesleanus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 266, 607-612.
- Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V. A., Todo, T., et al. (2003). Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Mol. Cell* 11, 59-67.
- Bullock, J., Jones, B., Tahlor, D., Winskill, N. & Quarrie, S. (1974). Sex hormones in *Mucorales*. The incorporation of C20 and C18 precursors into trisporic acids. *J. Gen. Microbiol.* 80, 301-306.
- Burgeff, H. (1924). *Untersuchungen über Sexualität und Parasitismus bei Mucorineen*. Bot. Abhñ. Heft.
- Calvo, A. (2008). The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi *Fungal Genet. Biol.* 45, 1053-1061.
- Campuzano, V., Galland, P., Senger, H., Alvarez, M. & Eslava, A. (1994). Isolation and characterization of phototropism mutants of *Phycomyces* insensitive to ultraviolet light. *Curr. Genet.* 26, 49-53.
- Campuzano, V., Galland, P., Eslava, A. P. & Alvarez, M. I. (1995). Genetic characterization of two phototropism mutants of *Phycomyces* with defects in the genes *madI* and *madJ*. *Curr. Genet.* 27, 524-527.

- Campuzano, V., Galland, P., Alvarez, M. & Eslava, A. (1996). Blue-light receptor requirement for gravitropism, autochemotropism and ethylene response in *Phycomyces*. *Photochem. Photobiol.* **63**, 686-694.
- Candau, R., Bejarano, E. R. & Cerdá-Olmedo, E. (1991). In vivo channeling of substrates in an enzyme aggregate for beta-carotene biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 4936-4940.
- Carattoli, A., Romano, N., Ballario, P., Morelli, G. & Macino, G. (1991). The *Neurospora crassa* carotenoid biosynthetic gene (*albino 3*) reveals highly conserved regions among prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* **266**, 5854-5859.
- Carnoy, J. (1870). *Recherches anatomiques et physiologiques sur les champignons*. Bull Soc Bot Belg.
- Cerdá-Olmedo, E. (1977). Behavioral genetics of *Phycomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 535-547.
- Cerdá-Olmedo, E. (2001). *Phycomyces* and the biology of light and color. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 503-512.
- Cerdá-Olmedo, E. & Hüttermann, A. (1986). Förderung und Hemmung der Carotinsynthese bei *Phycomyces* durch Aromaten. *Angew. Botanik* **60**, 59-70.
- Cerdá-Olmedo, E. & Lipson, E. (1987a). A biography of *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 7-26.
- Cerdá-Olmedo, E. & Lipson, E. (1987b). *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
- Chaudhary, S., Polaino, S., Shaky, V. P. S. & Idnurm, A. (2013). A new genetic linkage map of the zygomycete fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *PLoS ONE* **8**, e58931.
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L., van der Horst, G. T. J., Batschauer, A. & Ahmad, M. (2011). The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu Rev Plant Biol* **62**, 335-364.
- Chen, A. & Poulter, C. D. (1994). Isolation and characterization of *idsA*: the gene for the short chain isoprenyl diphosphate synthase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **314**, 399-404.
- Chen, C., Ringelberg, C. S., Gross, R. H., Dunlap, J. C. & Loros, J. J. (2009). Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*. *EMBO J.* **28**, 1029-1042.
- Chen, C., Dunlap, J. C. & Loros, J. J. (2010a). *Neurospora* illuminates fungal photoreception. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 922-929.
- Chen, C., DeMay, B. S., Gladfelter, A. S., Dunlap, J. C. & Loros, J. J. (2010b). Physical interaction between VIVID and white collar complex regulates photoadaptation in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 16715-16720.
- Cheng, P., Yang, Y., Gardner, K. H. & Liu, Y. (2002). PAS domain-mediated WC-1/WC-2 interaction is essential for maintaining the steady-state level of WC-1 and the function of both proteins in circadian clock and light responses of *Neurospora*. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 517-524.
- Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., He, Q. & Liu, Y. (2003). WHITE COLLAR-1, a multifunctional *Neurospora* protein involved in the circadian feedback loops, light sensing, and transcription repression of *wc-2*. *J. Biol. Chem.* **278**, 3801-3808.
- Christie, J. M. (2007). Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev Plant Biol* **58**, 21-25.
- Christie, J. M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M. & Briggs, W. R. (1999). LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 8779-8783.
- Cohen, R. J. (1978). Isolation of nuclei and chromatin from *Phycomyces blakesleeanus*. *Methods Cell Biol.* **17**, 89-92.
- Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., Weiss, R. L., Borkovich, K. A. & Dunlap, J. C. (2006). A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 10352-10357.
- Conaway, R., Brower, C. & Conaway, J. (2002). Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* **296**, 1254-1258.
- Cornell University. Dept. of Plant Breeding. (n.d.). *Neurospora V*. A synthetic medium favoring sexual reproduction.
- Corrochano, L. (2007). Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**, 725-736.
- Corrochano, L. (2011). Fungal photobiology: a synopsis. *IMA Fungus* **2**, 25-28.
- Corrochano, L. & Cerdá-Olmedo, E. (1988). Photomorphogenesis in *Phycomyces*: Dependence on environmental conditions. *Planta* **174**, 309-314.

- Corrochano, L. & Cerdá-Olmedo, E. (1990a). Photomorphogenesis in *Phycomyces*: competence period and stimulus-response relationships. *J. Photochem. Photobiol.* **B5**, 255-266.
- Corrochano, L. & Cerdá-Olmedo, E. (1990b). Photomorphogenesis in behavioural and colour mutants of *Phycomyces*. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **6**, 325-335.
- Corrochano, L. & Cerdá-Olmedo, E. (1992). Sex, light and carotenes: the development of *Phycomyces*. *Trends Genet.* **8**, 268-274.
- Corrochano, L. & Garre, V. (2010). Photobiology in the Zygomycota: multiple photoreceptor genes for complex responses to light. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 893-899.
- Corrochano, L., Galland, P., Lipson, E. & Cerdá-Olmedo, E. (1988). Photomorphogenesis in *Phycomyces*: Fluence-response curves and action spectra. *Planta* **174**, 309-314.
- Corrochano, L., Kuo, A., Marcet-Houben, M., Polaino, S., Salamov, A., Villalobos-Escobedo, J. M., Grimwood, J., Álvarez, M. I., Avalos, J., et al. (2016). Expansion of Signal Transduction Pathways in Fungi by Extensive Genome Duplication. *Curr. Biol.* **26**, 1577-1584.
- Crosson, S. & Moffat, K. (2001). Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 2995-3000.
- Crosson, S. & Moffat, K. (2002). Photoexcited structure of a plant photoreceptor domain reveals a light-driven molecular switch. *Plant Cell* **14**, 1067-1075.
- Crosson, S., Rajagopal, S. & Moffat, K. (2003). The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* **42**, 2-10.
- Curry, G. & Gruen, H. (1957). Negative phototropism of *Phycomyces* in the ultraviolet. *Nature* **179**, 1028-1029.
- Darwin, C. (1881). *The Power of Movement in Plants*. New York: Appleton and Company.
- Dasgupta, A., Chen, C., Lee, C., Gladfelter, A. S., Dunlap, J. C. & Loros, J. J. (2015). Biological Significance of Photoreceptor Photocycle Length: VIVID Photocycle Governs the Dynamic VIVID-White Collar Complex Pool Mediating Photo-adaptation and Response to Changes in Light Intensity. *PLoS Genet.* **11**, e1005215.
- Daub, M. & Payne, G. (1989). The role of carotenoids in resistance of fungi to cercosporin. *Phytopathology* **79**, 180-185.
- de Miguel T, Calo, P., Díaz, A. & Villa, T. (1997). The genus *Rhodosporidium*: a potential source of beta-carotene. *Microbiology* **13**, 67-70.
- Degli-Innocenti, F. & Russo, V. (1984). Isolation of new white collar mutants of *Neurospora crassa* and studies on their behavior in the blue light-induced formation of protoperithecia. *J. Bacteriol.* **159**, 757-761.
- Delbrück, M. & Reichardt, W. (1956). *Cellular mechanisms in differentiation and growth*. Ed. Rudnik.
- Domonkos, I., Kis, M., Gombos, Z. & Ughy, B. (2013). Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Prog. Lipid Res.* **52**, 539-561.
- Dong, W., Tang, X., Yu, Y., Nilsen, R., Kim, R., Griffith, J., Arnold, J. & Shüttler, H. (2008). Systems biology of the clock in *Neurospora crassa*. *PLoS ONE* **3**, e3105.
- Eibel, P., Schimek, C., Fries, V., Grolig, F., Schapat, T., Schmidt, W., Schneckenburger, H., Ootaki, T. & Galland, P. (2000). Statoliths in *Phycomyces*: characterization of octahedral protein crystals. *Fungal Genet. Biol.* **29**, 211-220.
- El-Jack, M., Mackenzie, A. & Bramley, P. (1988). The photoregulation of carotenoid biosynthesis in *Aspergillus giganteus* mut. *alba*. *Planta* **174**, 59-66.
- Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S. & Murillo, F. J. (2011). Light-dependent gene regulation in nonphototrophic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 128-135.
- Eslava, A., Alvarez, M. & E, C. (1974). Regulation of Carotene Biosynthesis in *Phycomyces* by Vitamin A and β -Ionone. *Eur J Bioch* **48**, 617-623.
- Eslava, A. P., Alvarez, M. I., Lipson, E. D., Presti, D. & Kong, K. (1976). Recombination between mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism. *Mol. Gen. Genet.* **147**, 235-241.
- Eslava, E. & Cerdá-Olmedo, E. (1974). Genetic control of phytoene dehydrogenation in *Phycomyces*. *Plant Sci. Lett.* **2**, 9-14.
- Estrada, A. F. & Avalos, J. (2009). Regulation and targeted mutation of *opsA*, coding for the NOP-1 opsin orthologue in *Fusarium fujikuroi*. *J. Mol. Biol.* **387**, 59-73.
- Estrada, A. F., Brefort, T., Mengel, C., Díaz-Sánchez, V., Alder, A., Al-Babili, S. & Avalos, J. (2009). *Ustilago maydis* accumulates beta-carotene at levels determined by a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Fungal Genet. Biol.* **46**, 803-813.

- Ettxebeste, O., Ni, M., Garzia, A., Kwon, N., Fischer, R., Yu, J., Espeso, E. & Ugalde, U. (2008). Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* 7, 38-48.
- Fankhauser, C. & Christie, J. M. (2015). Plant phototropic growth *Curr. Biol.* 25, R384-9.
- Fischer, E. & Lipson, C. (1988). Thinking About Science. Max Delbruck and the Origins of Molecular Biology. Ernst Peter Fischer and Carol Lipson. Norton, New York, 1988. 334 pp., illus Norton and Company, New York. 334.
- Flores, R., Cerdá-Olmedo, E. & Corrochano, L. (1998). Separate sensory pathways for photomorphogenesis in *Phycomyces*. *Photochemistry and Photobiology* 67, 467-472.
- Franchi, L., Fulci, V. & Macino, G. (2005). Protein kinase C modulates light responses in *Neurospora* by regulating the blue light photoreceptor WC-1 *Mol. Microbiol.* 56, 334-345.
- Freitag, M., Hickey, P. C., Raju, N. B., Selker, E. U. & Read, N. D. (2004). GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 41, 897-910.
- Froehlich, A. C., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (2003). Rhythmic binding of a WHITE COLLAR-containing complex to the frequency promoter is inhibited by FREQUENCY *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 5914-5919.
- Froehlich, A. C., Chen, C., Belden, W. J., Madeti, C., Roenneberg, T., Merrow, M., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (2010). Genetic and molecular characterization of a cryptochrome from the filamentous fungus *Neurospora crassa* *Eukaryotic Cell* 9, 738-750.
- Froehlich, A., Liu, Y., Loros, J. & Dunlap, J. (2002). White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* 297, 815-819.
- Fuller, K. K., Ringelberg, C. S., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (2013). The fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* regulates growth, metabolism, and stress resistance in response to light *MBio* 4.
- Galland, P. (1995). Ultraviolet killing and photoreactivation of *Phycomyces* spores. *Microbiol. Res.* 151, 9-17.
- Galland, P. (1998). Reception of far-ultraviolet light in *Phycomyces*: antagonistic interaction with blue and red light *Planta* 205, 269-276.
- Galland, P. (2001). Phototropism in *Phycomyces*. *Comprehensive series in photosciences photomovement* 1, 621-657. CUP Archive.
- Galland, P. & Lipson, E. (1985a). Modified action spectra of photogeotropic equilibrium in *Phycomyces blakesleeanus* mutants with defects in genes *madA*, *madB*, *madC*, and *madH* *Photochem. Photobiol.* 41, 331-335.
- Galland, P. & Lipson, E. (1987). Blue-light reception in *Phycomyces* phototropism: evidence for two photosystems operating in low- and high-intensity ranges *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 104-108.
- Galland, P. & Lipson, E. D. (1985b). Action spectra for phototropic balance in *Phycomyces blakesleeanus*: dependence on reference wavelength and intensity range *Photochem. Photobiol.* 41, 323-329.
- Galland, P., Finger, H. & Y, W. (2004). Gravitropism in *Phycomyces*: threshold determination on a clinostat centrifuge. *J. Plant Physiol.* 161, 733-739.
- García-Martínez, J., Brunk, M., Avalos, J. & Terpitz, U. (2015). The CarO rhodopsin of the fungus *Fusarium fujikuroi* is a light-driven proton pump that retards spore germination *Sci Rep* 5, 7798.
- Geisselbrecht, Y., Frühwirth, S., Schroeder, C., Pierik, A. J., Klug, G. & Essen, L. (2012). CryB from *Rhodobacter sphaeroides*: a unique class of cryptochromes with new cofactors *EMBO Rep.* 13, 223-229.
- Georgiou CD, Zervoudakis, G., Tairis, N. & Kornaros, M. (2001a). Beta-carotene production and its role in sclerotial differentiation of *Sclerotium rolfsii* *Fungal Genet. Biol.* 34, 11-20.
- Georgiou CD, Tairis, N. & Polycratis, A. (2001b). Production of β -carotene by *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in *sclerotium* differentiation. *Mycol. Res.* 105, 1110-1115.
- Gietz, R. D. & Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Meth. Enzymol.* 350, 87-96.
- Govind, N. & Cerdá-Olmedo, E. (1986). Sexual activation of carotenogenesis in *Phycomyces blakesleeanus*. *J. Gen. Microbiol.* 132, 2775-2780.
- Gómez-Mateo, J. (2005). *Análisis estructural y funcional de los genes crgB y mcwc-1a de Mucor circinelloides*. Tesis Doctoral.
- Grimaldi, B., Coiro, P., Filetici, P., Berge, E., Dobosy, J. R., Freitag, M., Selker, E. U. & Ballario, P. (2006). The *Neurospora crassa* White Collar-1 dependent blue light response requires acetylation of histone H3 lysine 14 by NGF-1 *Mol. Biol. Cell* 17, 4576-4583.
- Grolig, F., Herkenrath, H., Pumm, T., Gross, A. & Galland, P. (2004). Gravity suscepcion by buoyancy:

- floating lipid globules in sporangiophores of *Phycomyces* *Planta* **218**, 658-667.
- Gutierrez-Corona, F. & Cerdá-Olmedo, E. (1985). Environmental influences in the development of *Phycomyces* sporangiophores. *Exp Mycol* **9**, 56-63. *Exp Mycol*.
- Gutiérrez, A., López-García, S. & Garre, V. (2011). High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *J. Microbiol. Methods* **84**, 442-446.
- Hadley, C. W., Miller, E. C., Schwartz, S. J. & Clinton, S. K. (2002). Tomatoes, lycopene, and prostate cancer: progress and promise *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **227**, 869-880.
- Han, J., Zhao, W., Gao, Y. & Yuan, J. (2005). Effect of oxidative stress and exogenous β -carotene on sclerotial differentiation and carotenoid yield of *Penicillium* sp *Lett Appl Microbiol.* **40**, 412-417.
- Han, M., He, Q. & Zhang, W. (2012). Carotenoids production in different culture conditions by *Sporidiobolus pararoseus* *Prep. Biochem. Biotechnol.* **42**, 293-303.
- Harding, R. & Turner, R. (1981). Photoregulation of the Carotenoid Biosynthetic Pathway in Albino and White Collar Mutants of *Neurospora crassa* *Plant Physiol.* **68**, 745-749.
- Harispe, L., Portela, C., Scazzocchio, C., Peñalva, M. A. & Gorfinkiel, L. (2008). Ras GTPase-activating protein regulation of actin cytoskeleton and hyphal polarity in *Aspergillus nidulans* *Eukaryotic Cell* **7**, 141-153.
- He, Q. & Liu, Y. (2005). Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: from light-induced transcription to photoadaptation. *Genes Dev.* **19**, 2888-2899.
- He, Q., Chen, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K. & Liu, Y. (2002). White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* **297**, 840-843.
- Heijde, M., Zabolon, G., Corellou, F., Ishikawa, T., Brazard, J., Usman, A., Sanchez, F., Plaza, P., Martin, M., et al. (2010). Characterization of two members of the cryptochrome/photolyase family from *Ostreococcus tauri* provides insights into the origin and evolution of cryptochromes *Plant Cell Environ.* **33**, 1614-1626.
- Heintzen, C., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (2001). The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting *Cell* **104**, 453-464.
- Hemmi, H., Noike, M., Nakayama, T. & Nishino, T. (2003). An alternative mechanism of product chain-length determination in type III geranylgeranyl diphosphate synthase. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2186-2194.
- Hennig, A., Markwart, R., Esparza-Franco, M. A., Ladds, G. & Rubio, I. (2015). Ras activation revisited: role of GEF and GAP systems *Biol. Chem.* **396**, 831-848.
- Herrera-Estrella, A. & Horwitz, B. A. (2007). Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception *Mol. Microbiol.* **64**, 5-15.
- Herrou, J. & Crosson, S. (2011). Function, structure and mechanism of bacterial photosensory LOV proteins *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 713-723.
- Honda, S. & Selker, E. U. (2009). Tools for fungal proteomics: multifunctional neurospora vectors for gene replacement, protein expression and protein purification *Genetics* **182**, 11-23.
- Hunt, S. M., Thompson, S., Elvin, M. & Heintzen, C. (2010). VIVID interacts with the WHITE COLLAR complex and FREQUENCY-interacting RNA helicase to alter light and clock responses in *Neurospora* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 16709-16714.
- Idnurm, A. & Heitman, J. (2005). Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biol.* **3**, e95. Public Library of Science.
- Idnurm, A. & Heitman, J. (2010). Ferrochelatase is a conserved downstream target of the blue light-sensing White collar complex in fungi *Microbiology (Reading, Engl.)* **156**, 2393-2407.
- Idnurm, A., Rodríguez-Romero, J., Corrochano, L. M., Sanz, C., Iturriaga, E. A., Eslava, A. P. & Heitman, J. (2006). The *Phycomyces madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 4546-4551.
- Idnurm, A., Walton, F. J., Floyd, A. & Heitman, J. (2008). Identification of the sex genes in an early diverged fungus *Nature* **451**, 193-196.
- Idnurm, A., Verma, S. & Corrochano, L. M. (2010). A glimpse into the basis of vision in the kingdom *Mycota Fungal Genet. Biol.* **47**, 881-892.
- Karniol, B., Wagner, J. R., Walker, J. M. & Vierstra, R. D. (2005). Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Biochem. J.* **392**, 103-116.
- Káldi, K., González, B. H. & Brunner, M. (2006). Transcriptional regulation of the *Neurospora* circadian clock gene *wc-1* affects the phase of circadian output. *EMBO Rep.* **7**, 199-204.

- Kennis, J. T. M., van Stokkum, I. H. M., Crosson, S., Gauden, M., Moffat, K. & van Grondelle, R. (2004). The LOV2 domain of phototropin: a reversible photochromic switch *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 4512-4513.
- Kerppola, T. K. (2006a). Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells *Nat Protoc* **1**, 1278-1286.
- Kerppola, T. K. (2006b). Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 449-456.
- Klar, T., Kaiser, G., Hennecke, U., Carell, T., Batschauer, A. & Essen, L. (2006). Natural and non-natural antenna chromophores in the DNA photolyase from *Thermus thermophilus* *ChemBiochem* **7**, 1798-1806.
- Koyama, T. (1999). Molecular analysis of prenyl chain elongating enzymes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 1671-1676.
- Krinsky, N. I. & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol. Aspects Med.* **26**, 459-516.
- Kulkarni, S., Gish, P., van der Geer, M., Henkemeyer, M. & Pawson, T. (2000). Role of p120 Ras-GAP in directed cell movement. *J. Cell Biol.* **149**, 457-470.
- Kumagai, T. (1989). TEMPERATURE AND MYCOCHROME SYSTEM IN NEAR-UV LIGHT INDUCIBLE AND BLUE LIGHT REVERSIBLE PHOTOINDUCTION OF CONIDIATION IN *Photochem. Photobiol.* **50**, 793-798.
- Kuzina, V. & Cerdá-Olmedo, E. (2006). Modification of sexual development and carotene production by acetate and other small carboxylic acids in *Blakeslea trispora* and *Phycomyces blakesleeanus* *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 4917-4922.
- Kuzina, V. & Cerdá-Olmedo, E. (2007). Ubiquinone and carotene production in the Mucorales *Blakeslea* and *Phycomyces* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**, 991-999.
- la Concha Conejero A, De. (1983). Biosíntesis de carotenos y carotenoproteína en“ *Phycomyces blakesleeanus*.” *Tesis Doctoral*.
- la Guardia, De, M., Aragon, C., Murillo, F. & Cerdá-Olmedo, E. (1971). A carotenogenic enzyme aggregate in *Phycomyces*: evidence from quantitative complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **68**, 2012-2015.
- Lauter, F. & Yanofsky, C. (1993). Day/night and circadian rhythm control of con gene expression in *Neurospora* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 8249-8253.
- Lenzen, C., Cool, R. H., Prinz, H., Kuhlmann, J. & Wittinghofer, A. (1998). Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25Mm *Biochemistry* **37**, 7420-7430.
- Lewis, Z., Correa, A., Schwedtfeger, C., Link, K., Xie, X., Gomer, R., Thomas, T., Ebbale, D. & D, B. (2002). Overexpression of White Collar-1 (WC-1) activates circadian clock-associated genes, but is not sufficient to induce most light-regulated gene expression in *Mol. Microbiol.* **45**, 917-931.
- Lin, C. & Shalitin, D. (2003). Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 469-496.
- Lin, C. & Todo, T. (2005). The cryptochromes. *Genome Biol.* **6**, 220. BioMed Central Ltd.
- Linden, H. & Macino, G. (1997). White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa* *EMBO J.* **16**, 98-109.
- Linden, H., Ballario, P. & Macino, G. (1997a). Blue light regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* **22**, 141-150.
- Linden, H., Rodriguez-Franco, M. & Macino, G. (1997b). Mutants of *Neurospora crassa* defective in regulation of blue light perception. *Mol. Gen. Genet.* **254**, 111-118.
- Lipson, E. & Teresaka, D. (1981). Photogeotropism in *Phycomyces* double mutants. *Exp Mycol* **5**, 101-111.
- Liu, X., Li, H., Liu, Q., Niu, Y., Hu, Q., Deng, H., Cha, J., Wang, Y., Liu, Y. & He, Q. (2015). Role for Protein Kinase A in the *Neurospora* Circadian Clock by Regulating White Collar-Independent frequency Transcription through Phosphorylation of RCM-1 *Mol. Cell. Biol.* **35**, 2088-2102.
- Liu, Y., He, Q. & Cheng, P. (2003). Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2131-2138.
- Loros, J. J., Dunlap, J. C., Larrondo, L. F., Shi, M., Belden, W. J., Gooch, V. D., Chen, C., Baker, C. L., Mehra, A., et al. (2007). Circadian output, input, and intracellular oscillators: insights into the circadian systems of single cells *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **72**, 201-214.
- López-Díaz, I. & Lipson, E. (1983). Genetic analysis of hypertropic mutants of *Phycomyces* *Mol. Gen. Genet.* **190**, 318-325.

- Luria, S. & Borrous, J. (1957). Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Bacteriol.* **74**, 461-476.
- Macino, G., Baima, S., Carattoli, A., Morelli, G. & Valle, E. (1993). Blue light regulated expression of geranylgeranyl pyrophosphate synthetase (*albino-3*) gene in *Neurospora crassa*. *Molecular Biology and Application to Medical Mycology* **H69**, 117-124.
- Malzahn, E., Ciprianidis, S., Káldi, K., Schafmeier, T. & Brunner, M. (2010). Photoadaptation in *Neurospora* by competitive interaction of activating and inhibitory LOV domains. *Cell* **142**, 762-772.
- Marani, M., Tenev, T., Hancock, D., Downward, J. & Lemoine, N. R. (2002). Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3577-3589.
- Margolin, B., Freitag, M. & Selker, E. (1997). Improved plasmids for gene targeting at the *bis-3* locus of *Neurospora crassa* by electroporation. *Fungal Genet. Newslett.* **47**, 112. Fungal Genet. Newslett.
- Martín-Rojas, V., Greiner, H., Wagner, T., Fukshansky, L. & Cerdá-Olmedo, E. (1995). Specific tropism caused by ultraviolet C radiation in *Phycomyces* *Planta* **197**, 63-68.
- Massart, J. (1888). Recherches sur les organismes inférieurs 1. La loi de Weber vérifiée pour l'héliotropisme du champignon *Bull Acad R Sci Belg* **3**, 590-601.
- Mathews, S. & Sharrock, R. A. (1996). The phytochrome gene family in grasses (Poaceae): a phylogeny and evidence that grasses have a subset of the loci found in dicot angiosperms *Mol. Biol. Evol.* **13**, 1141-1150.
- McNally, M. & Free, S. (1988). Isolation and characterization of a *Neurospora* glucose-repressible gene *Curr. Genet.* **14**, 545-551.
- Medina, H. R., Cerdá-Olmedo, E. & Al-Babili, S. (2011). Cleavage oxygenases for the biosynthesis of trisporoids and other apocarotenoids in *Phycomyces* *Mol. Microbiol.* **82**, 199-208.
- Medina, J. & Cerdá-Olmedo, E. (1977). A quantitative model of *Phycomyces* phototropism. *J. Theor. Biol.* **69**, 709-719.
- Mehta, B. J. & Cerdá-Olmedo, E. (2001). Intersexual partial diploids of phycomyces *Genetics* **158**, 635-641.
- Mehta, B. J., Salgado, L. M., Bejarano, E. R. & Cerdá-Olmedo, E. (1997). New Mutants of *Phycomyces blakesleeanus* for (beta)-Carotene Production *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3657-3661.
- Meyer, P. W., Matus, I. J. & Berg, H. C. (1987). Avoidance of *Phycomyces* in a controlled environment. *Biophys. J.* **51**, 425-437.
- Milburn, M. V., Tong, L., deVos, A. M., Brünger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. & Kim, S. H. (1990). Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins *Science* **247**, 939-945.
- Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K. & Harashima, K. (1990). Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**, 6704-6712.
- Mooney, J. & Yager, L. N. (1990). Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans* *Genes Dev.* **4**, 1473-1482.
- Moran, N. A. & Jarvik, T. (2010). Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids *Science* **328**, 624-627.
- Murcia-Flores, L., Lorca-Pascual, J. M., Garre, V., Torres-Martínez, S. & Ruiz-Vázquez, R. M. (2007). Non-AUG translation initiation of a fungal RING finger repressor involved in photocarotenogenesis *J. Biol. Chem.* **282**, 15394-15403.
- Murillo, F. & Cerdá-Olmedo, E. (1976). Regulation of carotene synthesis in *Phycomyces*. *Mol. Gen. Genet.* **148**, 19-24.
- Murillo, F., Torres-Martínez, S., Aragón, C. & Cerdá-Olmedo, E. (1981). Substrate transfer in carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Eur. J. Biochem.* **119**, 511-516.
- Murillo, F., López-Calderon, I., López-Díaz, I. & E, C. (n.d.). β -Carotene producing strains of the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. U.S. Patent Office.
- Murillo, F. J. & Cerdá-Olmedo, E. (1976). Regulation of carotene synthesis in *Phycomyces*. *Mol. Genet. Genomics* **148**, 19-24.
- Müller, M. & Carell, T. (2009). Structural biology of DNA photolyases and cryptochromes *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 277-285.
- Navarro, E., Sandmann, G. & Torres-Martínez, S. (1995). Mutants of the carotenoid biosynthetic pathway of *Mucor circinelloides*. *Exp Mycol* **19**, 186-190.

- Navarro, E., Lorca-Pascual, J., Quiles-Rosillo, M., Nicolás, F., Garre, V., Torres-Martínez, S. & Ruiz-Vázquez, R. (2001). A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides* *Mol. Genet. Genomics* 266, 463-470.
- Nelson, M. A., Morelli, G., Carattoli, A., Romano, N. & Macino, G. (1989). Molecular cloning of a *Neurospora crassa* carotenoid biosynthetic gene (albino-3) regulated by blue light and the products of the white collar genes. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1271-1276.
- Ni, M., Gao, N., Kwon, S., Shin, K. & Yu, H. (2010). Regulation of *Aspergillus* Conidiation.
- Nicolás, F. E., Vila, A., Moxon, S., Cascales, M. D., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R. M. & Garre, V. (2015). The RNAi machinery controls distinct responses to environmental signals in the basal fungus *Mucor circinelloides* *BMC Genomics* 16, 237.
- Nieuwenhuis, M. & Vandenende, H. (1975). Sex specificity of hormone synthesis in *Mucor mucedo* *Arch. Microbiol.* 102, 167-169.
- Nsa, I. Y., Karunarathna, N., Liu, X., Huang, H., Boettger, B. & Bell-Pedersen, D. (2015). A novel cryptochrome-dependent oscillator in *Neurospora crassa*. *Genetics* 199, 233-245.
- Obraztsova, I. N., Prados, N., Holzmann, K., Avalos, J. & Cerdá-Olmedo, E. (2004). Genetic damage following introduction of DNA in *Phycomyces*. *Fungal Genet. Biol.* 41, 168-180.
- Ogura, K. & Koyama, T. (1998). Enzymatic Aspects of Isoprenoid Chain Elongation. *Chem. Rev.* 98, 1263-1276.
- Oldenburg, K., Vo, K., Michaelis, S. & Paddon, C. (1997). Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res.* 25, 451-452.
- Olmedo, M., Navarro-Sampedro, L., Ruger-Herreros, C., Kim, S., Jeong, B., Lee, B. & Corrochano, L. M. (2010a). A role in the regulation of transcription by light for RCO-1 and RCM-1, the *Neurospora* homologs of the yeast Tup1-Ssn6 repressor *Fungal Genet. Biol.* 47, 939-952.
- Olmedo, M., Ruger-Herreros, C., Luque, E. & Corrochano, L. (2010b). A complex photoreceptor system mediates the regulation by light of the conidiation genes *con-10* and *con-6* in *Neurospora crassa* *Fungal Genet. Biol.* 47, 352-363.
- Olmedo, M., Ruger-Herreros, C., Luque, E. & Corrochano, L. (2013). Regulation of transcription by light in *Neurospora crassa*: A model for fungal photobiology *Fungal Biology Reviews* 27, 10-18.
- Orejas, M., Peláez, M., Alvarez, M. & Eslava, A. (1987). A genetic map of *Phycomyces blakesleeanus* *Mol. Gen. Genet.* 210, 69-76.
- Peñalva, M. A. (2005). Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet. Biol.* 42, 963-975.
- Peter, E., Dick, B. & Baeurle, S. A. (2012). Illuminating the early signaling pathway of a fungal light-oxygen-voltage photoreceptor *Proteins* 80, 471-481.
- Pokorny, R., Klar, T., Hennecke, U., Carell, T., Batschauer, A. & Essen, L. (2008). Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 21023-21027.
- Polaino, S., Herrador, M., Cerdá-Olmedo, E. & Barrero, A. (2010). Splitting of beta-carotene in the sexual interaction of *Phycomyces* *Org. Biomol. Chem.* 8, 4229-4231.
- Polaino, S., Gonzalez-Delgado, J., Arteaga, P., Herrador, M., Barrero, A. & Cerdá-Olmedo, E. (2012). Apocarotenoids in the sexual interaction of *Phycomyces blakesleeanus*. *Org. Biomol. Chem.* 10, 3002-3009.
- Polaino, S., Shakya, V., Miralles-Durán, A., Chaudhary, S., Sanz, C., Eslava, A., Corrochano, L. & Idnurm, A. (2017). Ras signaling in phototropic and circadian responses in fungi. *Scientific Report.* 7- 44790.
- Pontecorvo, G., Roper, L., Chemmons, K. & Bufton, W. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. In: *Advances in Genetics* 141-238.
- Prado, M. M., Prado-Cabrero, A., Fernández-Martín, R. & Avalos, J. (2004). A gene of the opsin family in the carotenoid gene cluster of *Fusarium fujikuroi*. *Curr. Genet.* 46, 47-58.
- Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, C., Schöser, M., Haas, H., Espeso, E., Atoui, A., Calvo, A. M. & Fischer, R. (2008). Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Biol.* 18, 255-259.
- Quiles-Rosillo, M., Ruiz-Vázquez, R., Torres-Martínez, S. & Garre, V. (2005). Light induction of the carotenoid biosynthesis pathway in *Blakeslea trispora*. *Fungal Genet. Biol.* 42, 141-153.
- Rao, A. & Rao, L. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res* 55, 207-216.
- Rauscher, S., Pacher, S., Hedtke, M., Knemeyer, O. & Fischer, R. (2016). A phosphorylation code of the *Aspergillus nidulans* global regulator VelvetA (VeA) determines specific functions. *Mol. Microbiol.* 99, 909-924.

- Revuelta, J. & Eslava, A. (1983). A new gene (*carC*) involved in the regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Molecular and General Genetics* **192**, 225-229.
- Riechmann, J., Ito, T. & Meyerowitz, E. (1999). Non-AUG initiation of AGAMOUS mRNA translation in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8505-8512.
- Rivero, F. & Cerdá-Olmedo, F. (1994). Spore germination in *Phycomyces blakesleeanus*. *Mycologia* **86**, 781-786.
- Robbins, W. & Kavanagh, F. (1942). Growth substances and dormancy of spores of *Phycomyces*. *Botanical Gazette* **104**, 224-242.
- Rockwell, N., Su, Y. & Lagarias, J. (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 837-858.
- Rodríguez-Romero, J. & Corrochano, L. (2004). The gene for the heat-shock protein HSP100 is induced by blue light and heat-shock in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Curr. Genet.* **46**, 295-303.
- Rodríguez-Romero, J. & Corrochano, L. M. (2006). Regulation by blue light and heat shock of gene transcription in the fungus *Phycomyces*: proteins required for photoinduction and mechanism for adaptation to light. *Mol. Microbiol.* **61**, 1049-1059.
- Rodríguez-Romero, J., Hedtke, M., Kastner, C., Müller, S. & Fischer, R. (2010). Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 585-610.
- Rodríguez-Sáiz, M., Paz, B., La Fuente, De, J., López-Nieto, M., Cabri, W. & Barredo, J. (2004). *Blakeslea trispora* genes for carotene biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5589-5594.
- Romano, N. & Macino, G. (1991). *Unpublished results*.
- Roncero, M. & Cerdá-Olmedo, E. (1982). Genetics of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Curr. Genet.* **5**, 5-8.
- Rosales-Saavedra, T., Esquivel-Naranjo, E., Casa-Flores, S., Martínez-Hernández, P., Ibarra-Laclette, E., Cortes-Penagos, C. & Herrera-Estrella, A. (2006). Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology* **152**, 3305-3317.
- Röhrig, J., Kastner, C. & Fischer, R. (2013). Light inhibits spore germination through phytochrome in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **59**, 55-62.
- Ruger-Herreros, C. (2014). *Transcription factor that regulate development and light responses in Neurospora crassa and Aspergillus nidulans*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Ruger-Herreros, C., Rodríguez-Romero, J., Fernández-Barranco, R., Olmedo, M., Fischer, R., Corrochano, L. & Canovas, D. (2011). Regulation of conidiation by light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **188**, 809-822.
- Ruiz-Albert, J., Cerdá-Olmedo, E. & Corrochano, L. M. (2002). Genes for mevalonate biosynthesis in *Phycomyces*. *Mol. Genet. Genomics* **266**, 768-777.
- Ruiz-Hidalgo, M., Benito, E., Sandmann, G. & Eslava, A. (1997). The phytoene dehydrogenase gene of *Phycomyces*: regulation of its expression by blue light and vitamin A. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 734-744.
- Ruiz-Hidalgo, M. J., Eslava, A. P., Alvarez, M. I. & Benito, E. P. (1999). Heterologous expression of the *Phycomyces blakesleeanus* phytoene dehydrogenase gene (*carB*) in *Mucor circinelloides*. *Curr. Microbiol.* **39**, 259-264.
- Sagami, H., Korenaga, T. & Ogura, K. (1993). Geranylgeranyl diphosphate synthase catalyzing the single condensation between isopentenyl diphosphate and farnesyl diphosphate. *J. Biochem.* **114**, 118-121.
- Saikia, S. & Scott, B. (2009). Functional analysis and subcellular localization of two geranylgeranyl diphosphate synthases from *Penicillium paxilli*. *Mol. Genet. Genomics* **282**, 257-271.
- Saikia, S., Nicholson, M., Young, C., Parker, E. & Scott, B. (2008). The genetic basis for indole-diterpene chemical diversity in filamentous fungi. *Mycol. Res.* **112**, 184-199.
- Salgado, L., Bejarano, E. & Cerdá-Olmedo, E. (1989). Carotene-superproducing mutants of *Phycomyces blakesleeanus*. *Exp Mycol* **13**, 332-336.
- Salomon, M., Christie, J., Knieb, E., Lempert, U. & Briggs, W. (2000). Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* **39**, 9401-9410.
- Sancar, A. (2003). Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem. Rev.* **103**, 2203-2237.
- Sancar, G., Sancar, C., Brügger, B., Ha, N., Sachsenheimer, T., Gin, E., Wdowik, S., Lohmann, I., Wieland, F., et al. (2011). A global circadian repressor controls antiphasic expression of metabolic genes in *Neurospora*. *Mol. Cell* **44**, 687-697.

- Sandmann, G., Misawa, N., Wiedemann, M., Vittorioso, P., Carattoli, A., Morelli, G. & Macino, G. (1993). Functional identification of *al-3* from *Neurospora crassa* as the gene for geranylgeranyl pyrophosphate synthase by complementation with *crt* genes, in vitro characterization of the gene product and mutant analysis. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **18**, 245-251.
- Sanz, C., Alvarez, M. I., Orejas, M., Velayos, A., Eslava, A. P. & Benito, E. P. (2002). Interallelic complementation provides genetic evidence for the multimeric organization of the *Phycomyces blakesleeanus* phytoene dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **269**, 902-908.
- Sanz, C., Rodríguez-Romero, J., Idnurm, A., Christie, J. M., Heitman, J., Corrochano, L. M. & Eslava, A. P. (2009). *Phycomyces* MADB interacts with MADA to form the primary photoreceptor complex for fungal phototropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 7095-7100.
- Sanz, C., Velayos, A., Álvarez, M. I., Benito, E. P. & Eslava, A. P. (2011). Functional analysis of the *Phycomyces carRA* gene encoding the enzymes phytoene synthase and lycopene cyclase. *PLoS ONE* **6**, e23102.
- Schafmeier, T., Haase, A., Káldi, K., Scholz, J., Fuchs, M. & Brunner, M. (2005). Transcriptional feedback of *Neurospora* circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. *Cell* **122**, 235-246.
- Schimpek, C. & Wöstemeyer, J. (2009). Carotene derivatives in sexual communication of zygomycete fungi. *Phytochemistry* **70**, 1867-1875.
- Schmidhauser, T., Lauter, F., Schumacher, M., Zhou, W., Russo, V. & Yanofsky, C. (1994). Characterization of *al-2*, the phytoene synthase gene of *Neurospora crassa*. Cloning, sequence analysis, and photoregulation. *J. Biol. Chem.* **269**, 12060-12066.
- Schubert, D., Raudaskoski, M., Knabe, N. & Kothe, E. (2006). Ras GTPase-activating protein *gap1* of the homobasidiomycete *Schizophyllum commune* regulates hyphal growth orientation and sexual development. *Eukaryotic Cell* **5**, 683-695.
- Schwerdtfeger, C. & Linden, H. (2000). Localization and light-dependent phosphorylation of white collar 1 and 2, the two central components of blue light signaling in *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 414-422.
- Schwerdtfeger, C. & Linden, H. (2001). Blue light adaptation and desensitization of light signal transduction in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* **39**, 1080-1087.
- Schwerdtfeger, C. & Linden, H. (2003). VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J.* **22**, 4846-4855.
- Selby, C. P. & Sancar, A. (2006). A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 17696-17700.
- Shakya, V. & Idnurm, A. (2017). The inhibition of mating in *Phycomyces blakesleeanus* by light is dependent on the MadA-MadB complex that acts in a sex-specific manner. *Fungal Genet. Biol.*
- Sharma, A. K., Spudich, J. L. & Doolittle, W. F. (2006). Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility. *Trends Microbiol.* **14**, 463-469.
- Shrode, L., Lewis, Z., White, L., Bell-Pedersen, D. & Ebbole, D. (2001). *vvd* is required for light adaptation of conidiation-specific genes of *Neurospora crassa*, but not circadian conidiation. *Fungal Genet. Biol.* **32**, 169-181.
- Silva, F., Torres-Martínez, S. & Garre, V. (2006). Distinct white collar-1 genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. *Mol. Microbiol.* **61**, 1023-1037.
- Silva, F., Navarro, E., Peñaranda, A., Murcia-Flores, L., Torres-Martínez, S. & Garre, V. (2008). A RING-finger protein regulates carotenogenesis via proteolysis-independent ubiquitylation of a white collar-1-like activator. *Mol. Microbiol.* **70**, 1026-1036.
- Smith, K., Sancar, G., Dekhang, R., Sullivan, C., Li, S., Tag, A., Sancar, C., Bredeweg, E., Priest, H., et al. (2010). Transcription factors in light and circadian clock signaling networks revealed by genome wide mapping of direct targets for *Neurospora* White Collar complex. *Eukaryotic Cell* **9**, 1549-1556.
- Stahl, W. & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med.* **24**, 345-351.
- Stinnet, M., Espeso, E., Cobero, L., Araújo-Bazán, L. & Calvo, A. (2007). *Aspergillus nidulans* *VeA* subcellular localization is dependent on the importin α carrier and on light. *Mol. Microbiol.* **63**, 242-255.
- Sutter, R. (1975). Mutations affecting sexual development in *Phycomyces blakesleeanus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 127-130.

- Tagua, V., Medina, H., Martín-Domínguez, R., Eslava, A., Corrochano, L., Cerdá-Olmedo, E. & Idnurm, A. (2012). A gene for carotene cleavage required for pheromone biosynthesis and carotene regulation in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Fungal Genet. Biol.* **49**, 398-404.
- Tagua, V., Pausch, M., Eckel, M., Gutiérrez, G., Miralles-Durán, A., Sanz, C., Eslava, A., Pokorný, R., Corrochano, L. M. & Batschauer, A. (2015). Fungal cryptochrome with DNA repair activity reveals an early stage in cryptochrome evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 15130-15135.
- Tagua, V. G. (2012). *Una aproximación genómica a la regulación por la luz de la transcripción en Phycomyces blakesleeanus*. Tesis Doctoral.
- Talora, C., Franchi, L., Linden, H., Ballario, P. & Macino, G. (1999). Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction *EMBO J.* **18**, 4961-4968.
- Tanaka, K., Matsumoto, K. & Toh-E, A. (1989). *IRA1*, an inhibitory regulator of the RAS-cyclic AMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 757-768.
- Taylor, R., Walker, D. & McInnes, R. (1993). *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1677-1678.
- Thiry, G. (1984). Plasmids of the epiphytic bacterium *Erwinia uredovora*. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1623-1631.
- Thornton, R. (1972). Alternative fruiting pathways in *Phycomyces* *Plant Physiol.* **49**, 194-197.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G., Zabicky-Zissman, J., Lockington, R. & Davies, R. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans* *Gene* **26**, 205-221.
- Tisch, D. & Schmoll, M. (1994). Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 5-8. Springer-Verlag.
- Todo, T. (1999). Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family *Mutat. Res.* **434**, 89-97.
- Torres-Martínez, S., Murillo, F. & Cerdá-Olmedo, E. (1980). Genetics of lycopene cyclization and substrate transfer in beta-carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Genet. Res.* **36**, 299-309.
- Vanmulders, R. & AJ, V. (1986). Effects of pH and cations on the germination induction of *Phycomyces* spores with carboxylic acids. *Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen* **181**, 103-115.
- Velayos, A., Eslava, A. P. & Iturriaga, E. A. (2000). A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5509-5519.
- Velayos, A., Papp, T., Aguilar-Elena, R., Fuentes-Vicente, M., Eslava, A. P., Iturriaga, E. A. & Álvarez, M. I. (2003). Expression of the *carG* gene, encoding geranylgeranyl pyrophosphate synthase, is up-regulated by blue light in *Mucor circinelloides*. *Curr. Genet.* **43**, 112-120.
- Vogel, H. (1956). A convenient growth medium from *Neurospora* (Medium N). *Microbial Geneti. Bull* **13**, 42-43.
- Vogel, H. (1964). Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *Am. Nat.* **98**, 435-446.
- Vogt, N. & Seiler, S. (2008). The RHO1-specific GTPase-activating protein LRG1 regulates polar tip growth in parallel to Ndr kinase signaling in *Neurospora*. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4554-4569.
- Wang, B., Zhou, X., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. (2016). Alternative Use of DNA Binding Domains by the *Neurospora* White Collar Complex Dictates Circadian Regulation and Light Responses. *Mol. Cell. Biol.* **36**, 781-793.
- Wang, Y., Boguski, M., Riggs, M., Rodgers, L. & Wigler, M. (1991). *sar1*, a gene from *Schizosaccharomyces pombe* encoding a protein that regulates *ras1*. *Mol. Biol. Cell* **2**, 453-465.
- Weinkove, D., Poyatos, J., Greiner, H., Oltra, E., Avalos, J., Fukshansky, L., Barrero, A. & Cerdá-Olmedo, E. (1998). Mutants of *Phycomyces* with decreased gallic acid content. *Fungal Genet. Biol.* **25**, 196-203.
- Weissman, A., Shabek, N. & Ciechanover, A. (2011). The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 605-620.
- Welchman, R., Gordon, C. & Mayer, R. (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 599-609.
- Wenzler, D., Reinhardt, M. & Fukshansky, L. (2001). Topology of an intracellular transduction chain (phototropism of *Phycomyces*): 1. Joint review of functional, temporal, and spatial aspects. *J. Theor. Biol.* **211**, 313-332.
- Will, O., Ruddat, M., Garber, E. & Kezdy, F. (1984). Characterization of carotene accumulation in species of the fungal genus *Ustilago* using high-performance liquid chromatography. *Curr. Microbiol.* **10**, 57-63.
- Will, O., Ruddat, M. & Newland, N. (1985). Characterization of Carotene Accumulation in Species of

- the Fungal Genus *Ustilago* Using High-Performance Liquid Chromatography. *Botanical Gazette* 146, 204-207.
- Xu, G., Lin, B., Tanaka, K., Dunn, D., Wood, D., Gesteland, R., White, R., Weiss, R. & Tamanai, F. (1990). The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements *ira* mutants of *S. cerevisiae*. *Cell* 63, 835-841.
- Yoshida, Y. & Hasunuma, K. (2004). Reactive oxygen species affect photomorphogenesis in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 279, 6986-6993.
- Zeilinger, S., Martín, J. & García-Estrada, C. (2015). *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites*. Springer.
- Zhenzhong, Y., Armant, O. & Fischer, R. (2016). Fungi use the SakA (HogA) pathway for phytochrome-dependent light signalling. *Nature Microbiology*.
- Zhou, Z., Liu, X., Hu, Q., Zhang, N., Sun, G., Cha, J., Wang, Y., Liu, Y. & He, Q. (2013). Suppression of WC-independent frequency transcription by RCO-1 is essential for *Neurospora* circadian clock. *PNAS* 110, E4867-4874.
- Zoltowski, B. D. & Crane, B. R. (2008). Light activation of the LOV protein vivid generates a rapidly exchanging dimer. *Biochemistry* 47, 7012-7019.
- Zoltowski, B., Schwerdtfeger, C., Widom, J., Loros, J., Bilwes, A., Dunlap, J. & Crane, B. (2007). Conformational switching in the fungal light sensor Vivid. *Science* 316, 1054-1057.

